

SUÉLEN WOLF

**CARACTERÍSTICAS DE VIRULÊNCIA EM ESTIRPES DE
AEROMONAS spp.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Cyntia Maria Telles Fadel Picheth

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Katia Paludo

CURITIBA

2012

AGRADECIMENTO

Tenho a agradecer primeiramente a Deus por ter me concedido a vida e por me presentear com uma maravilhosa família. Agradeço a minha mãe Lourdes Pizzatto Wolf por todo o amor, apoio e por sempre estar presente e torcendo por minhas conquistas, ao meu pai Eunir Wolf por todo o carinho e ensinamentos de coragem e humildade e ao meu irmão por toda a sua alegria e incentivos.

As minhas orientadoras Prof^a. Dr^a. Cyntia Maria Telles Fadel Picheth e Prof^a. Dr^a Katia Paludo por todo o apoio, ajuda e confiança depositada em mim.

Ao pessoal do laboratório de bacteriologia clínica da UFPR, Flávia, Carolzinha, Cristina, Cibelle, Mônica, Marina, Ana Carolina, Fagna e Fernando por compartilharem conhecimentos e estarem presentes nos bons e maus momentos durante esta caminhada

E ao pessoal do Laboratório de Bioquímica Clínica e Enzimologia da UFPR que de uma forma ou de outra ajudaram na realização deste trabalho.

Agradeço o laboratório Central do Paraná-LACEN em especial a Sônia Farah e ao Laboratório Municipal de Curitiba pelo fornecimento das estirpes de *Aeromonas*.

Ao meu namorado Marcé André Dametto por toda a compreensão e amor em todos os momentos em que precisei me ausentar e por toda ajuda na formatação deste trabalho.

A todos meus amigos em especial a Flávia Emannoelli que contribuíram com sua amizade e com sugestões efetivas para a realização deste trabalho, gostaria de expressar minha profunda gratidão.

Agradeço a CAPES, pela bolsa concedida durante os anos do curso.

RESUMO

Bactérias do gênero *Aeromonas* são capazes de causar uma série de infecções em humanos variando de gastroenterite a septicemia. O objetivo deste trabalho foi verificar a presença de características associadas com virulência em 100 estirpes de *Aeromonas* isoladas no Paraná, incluindo 63 estirpes de *A. caviae*, 13 *A. hydrophila*, 13 *A. veronii* sobria, 3 *A. trota* e 8 *Aeromonas* spp. A PCR foi utilizada para verificar a presença de genes de virulência associados com atividade hemolítica (*aer*, *aerA* e *hlyA*), atividade de proteases extracelulares (*lip* e *ela*), enterotoxinas citotônicas (*alt* e *ast*), enterotoxina citotóxica (*act*), toxinas do tipo Shiga (*stx*₁ e *stx*₂), marcadores dos Sistemas de Secreção Tipo Três (*ascV* e *ascFG*) e Tipo Seis (*vasH*). A capacidade de produzir hemólise foi determinada empregando eritrócitos humanos, e a atividade citotóxica em células HRT18. Noventa e seis por cento das *Aeromonas* apresentaram pelo menos um dos genes de virulência pesquisados, sendo a prevalência *ela* 83%, *lip* 79%, *act* 21%, *aerA* 20%, *vasH* 19%, *hlyA*, *asFG* e *ast* 16%, *alt* 12%, *ascV* 7%, *aer* 3%, *stx*₁ e *stx*₂ 0%. Um maior número de genes de virulência foi encontrado nas estirpes de *A. hydrophila* (4-10), em *A. veronii* sobria a maioria (77%) das estirpes apresentou 3 a 4 genes, em *A. caviae* predominaram os isolados com 2 genes, enquanto em *A. trota* o número de genes de virulência foi de 1 e 2, e em *Aeromonas* spp 1 a 6. Quatro estirpes não apresentaram nenhum dos genes de virulência pesquisados, entretanto apresentaram atividade hemolítica mostrando a importância dos ensaios celulares na determinação das características de virulência dessas bactérias. A maioria (84%) das bactérias apresentou atividade hemolítica, incluindo 100% de *A. hydrophila* e *A. veronii* sobria; e 44% delas apresentou citotoxicidade, com predomínio entre *A. veronii* sobria (84,6%) e *A. hydrophila* (76,9%). O elevado número de genes de virulência e as atividades hemolítica e citotóxica, presentes em todas ou na maioria das estirpes destas duas espécies, sugere que as bactérias deste grupo são as que apresentam maior potencial de virulência.

Palavras-chave: *Aeromonas*, fatores de virulência, enterotoxina citotônica, enterotoxina citotóxica, proteases extracelulares, aerolisinas, toxinas Shiga, TTSS, T6SS.

ABSTRACT

Aeromonas are capable to cause a number of human infections ranging from gastroenteritis to septicemia. The objective of this study was to verify the presence of characteristics associated with virulence in 100 strains of *Aeromonas* isolated in Paraná, including 63 strains of *A. caviae*, 13 *A. hydrophila*, 13 *A. veronii* sobria, 3 *A. trota* and 8 *Aeromonas* spp. PCR was used to verify the presence of virulence genes associated with hemolytic activity (*aer*, *aerA* and *hlyA*), extracellular protease activity (*lip* and *ela*), cytotoxic enterotoxins (*alt* and *ast*), cytotoxic enterotoxin (*act*), Shiga toxins (*stx*₁ and *stx*₂), Type Three (*ascV* and *ascFG*) and Six (*vasH*) Secretion Systems markers. The ability to produce hemolysis was determined using human erythrocytes and cytotoxic activity in cells HRT18. Ninety-six percent of *Aeromonas* had at least one of the virulence genes studied, the prevalence being *ela* 83%, *lip* 79%, *act* 21%, *aerA* 20%, *vasH* 19%, *hlyA*, *ascFG* and *ast* 16%, *alt* 12%, *ascV* 7%, *aer* 3%, *stx*₁ and *stx*₂ 0%. A greater number of virulence genes was found in strains of *A. hydrophila* (4-10), in *A. veronii* sobria the majority (77%) strains showed 3 to 4 genes, in *A. caviae* predominated isolates with two genes, while in *A. trota* the number of virulence genes was 1 and 2, and in *Aeromonas* spp 1-6. Four strains had no virulence genes, however showed hemolytic activity indicating the importance of cellular assays to determine the virulence characteristics in these bacteria. The majority (84%) of the bacteria showed hemolytic activity, including 100% of *A. hydrophila* and *A. veronii* sobria, and 44% of them showed cytotoxicity, with a predominance of *A. veronii* sobria (84.6%) and *A. hydrophila* (76.9%). The higher number of virulence genes and hemolytic and cytotoxic activities, present in all or most of the strains of these two species, suggests that bacteria of these groups present the greatest virulence potential.

Keywords: *Aeromonas*, virulence factors, cytotoxic enterotoxins, cytotoxic enterotoxin, extracellular protease, aerolysin, Shiga toxins, TTSS, T6SS.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 –	PRODUTOS DE PCR PARA GENES DE VIRULÊNCIA.....	43
FIGURA 2 –	FREQUÊNCIA DOS GENES DE VIRULÊNCIA NAS ESTIRPES DE <i>AEROMONAS</i>	48
FIGURA 3 –	ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DOS AMPLICONS DE <i>AEROMONAS</i> 297M, F2, F1, 93c, 5LM, 49H, COM O GEME <i>ascFG</i> DE <i>Aeromonas hydrophila</i> ESTIRPE AH1	56
FIGURA 4 –	ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DOS AMPLICONS DE <i>AEROMONAS</i> Loc 81, 44, 60, COM O GENE <i>ascFG</i> DE <i>Aeromonas hydrophila</i> ESTIRPES AH-1	57
FIGURA 5 –	ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DOS AMPLICONS DE <i>AEROMONAS</i> 49H COM O GENE <i>ascV</i> DE <i>Aeromonas</i> <i>veronii</i> ESTIRPES MTCC 3249	58
FIGURA 6 –	ALTERAÇÕES MORFOLÓGICA ENCONTRADAS EM CÉLULAS HRT 18 NA PRESENÇA DE ESTIRPES DE <i>AEROMONAS</i>	70

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 –	ESPÉCIES VÁLIDAS E PROPOSTAS NO GÊNERO <i>AEROMONAS</i>	14
TABELA 2 –	SEQÜÊNCIAS DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES (CONTINUA)	36
TABELA 3 –	COMPONENTES DA PCR.....	37
TABELA 4 –	GENES DE VIRULÊNCIA NAS ESTIRPES DE <i>AEROMONAS</i> (CONTINUA).....	45
TABELA 5 –	DISTRIBUIÇÃO DOS GENES DE VIRULÊNCIA NAS ESPÉCIES DE <i>AEROMONAS</i>	49
TABELA 6 –	GENÓTIPOS ENCONTRADOS ENTRE AS ESTIRPES DE <i>AEROMONAS</i> (CONTINUA).....	50
TABELA 7 –	RESULTADOS FENOTÍPICOS E GENOTÍPICOS ENCONTRADOS NAS ESTIRPES DE <i>AEROMONAS</i> (CONTINUA)	52
TABELA 8 –	SEQÜÊNCIAS DO GENBANK QUE PRODUZIRAM ALINHAMENTOS SIGNIFICATIVOS COM OS AMPLICONS DE <i>ascFG</i>	56
TABELA 9 –	SEQUENCIA DO GENBANK QUE PRODUZIU ALINHAMENTO SIGNIFICATIVO COM O AMPLICON <i>ascV</i> DA ESTIRPE 49H.....	57
TABELA 10 –	EFEITO DO TEMPO DE CULTIVO BACTERIANO SOBRE OS RESULTADOS DE ENSAIOS DE HEMÓLISE.....	59
TABELA 11 –	EFEITO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO CULTURA-ERITRÓCITOS SOBRE OS ENSAIOS DE HEMÓLISE	60
TABELA 12 –	PADRÕES OBSERVADOS NOS ENSAIOS DE HEMÓLISE PARA ESTIRPES DE <i>AEROMONAS</i> (CONTINUA).....	61
TABELA 13 –	ATIVIDADE DOS SOBRENADANTES DE CULTURAS DE <i>AEROMONAS</i> SOBRE ERITRÓCITOS HUMANOS (CONTINUA)	63
TABELA 14 –	HEMÓLISE DA CULTURA TOTAL VERSUS SOBRENADANTE (CONTINUA).....	65
TABELA 15 –	CITOTOXICIDADE DAS ESTIRPES DE <i>AEROMONAS</i> (CONTINUA)	67
TABELA 16 –	FENÓTIPOS ENCONTRADOS ENTRE AS ESTIRPES DE <i>AEROMONAS</i>	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ΔT_m	– Variação da temperatura de <i>melting</i>
$\mu\text{g}/\mu\text{L}$	– Micrograma por microlitro
16S Rdna	– Gene codificador do RNA ribossomal 16S
AA	– Ágar <i>Aeromonas</i>
<i>Act</i>	– Gene codificador da Enterotoxina Citotóxica
<i>Era</i>	– Gene codificador da Aerolisina
<i>Alt</i>	– Gene codificador da Enterotoxina Termo-Lábil
Amp	– Ampicilina
<i>ascV ascFascG</i>	– Genes codificadores do Sistema de Secreção Tipo Três
<i>Ast</i>	– Gene codificador da Enterotoxina Termoestável
cAMP	– Adenosina Monofosfato Cíclico
CHO	– Células de Ovário de Hamster Chinês
CIN	– Cefsulodina-irgasan-novobiocina
dNTP	– Desoxiribonucleotídeo Trifosfato
EHEC	– <i>Escherichia coli</i> enterohemorágica
HE	– Ágar Hektoen
HGs	– Grupos de Hibridização
<i>hlyA</i>	– Gene codificador da β -hemolisina HlyA
IL-1	– Interleucina-1
IL-6	– Interleucina-6
ITU	– Infecção do Trato Urinário
KDa	– kilodalton
<i>lipA</i>	– Gene codificador da Lipase
MBL	– Metallo- β -Lactamase
MTT	– 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)2,5-Difenil Brometo de Tetrazólio)
O/129	– 2,4-diamino-6,7-diisopropilpteridina (agente vibriostático)
Pb	– Pares de Bases
PCR	– Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês, Polymerase Chain Reaction)
PFGE	– Pulsed Field Gel-Electrophoresis
PGE2	– Prostaglandina E2

RFLP	– Polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição (do inglês, Restriction fragment lenght polymorphism)
RPM	– Rotações por minuto
SS	– Ágar Salmonella-Shigella
<i>stx₁, stx₂</i>	– Genes codificadores das toxinas Shiga Stx1 e Stx2
T6SS	– Sistema de secreção tipo seis
TCBS	– Ágar-Tiosulfato-Citrato-Sais Biliares-Sacarose
TTSS/T3SS	– Sistema de secreção tipo três
UFC/ml	– Unidades Formadoras de Colônia por mililitro
UV	– Ultra-Violeta
V	– Voltagem
<i>vasH, vasK, hpc</i>	– Genes Codificadores do Sistema de Secreção Tipo Seis
XLD	– Ágar desoxicolato-lisina-xilose

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1 TAXONOMIA	13
2.2 HABITAT E FORMAS DE TRANSMISSÃO	15
2.3 CULTIVO E IDENTIFICAÇÃO	16
2.4 INFECÇÕES CAUSADAS POR <i>AEROMONAS</i>	18
2.4.1 Gastroenterite.....	19
2.4.2 Septicemia	21
2.4.3 Pele e tecidos moles.....	22
2.4.4 Infecções intra-abdominais.....	22
2.4.5 Infecção do trato respiratório.....	23
2.4.6 Outras infecções associadas com <i>Aeromonas</i>	23
2.5 FATORES DE VIRULÊNCIA.....	24
2.5.1 Toxinas	25
2.5.1.1 Hemolisinas	25
2.5.1.2 Enterotoxinas	27
2.5.1.3 Toxina Shiga.....	29
2.5.1.4 Enzimas hidrolíticas	29
2.5.2 Sistema de Secreção Tipo III (T3SS, TTSS).....	30
2.5.3 Sistema de Secreção Tipo 6.....	31
2.6 RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS.....	32
3 OBJETIVOS	34
3.1 OBJETIVO GERAL.....	34
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1 AMOSTRA.....	35
4.2 ENSAIOS MOLECULARES.....	35
4.2.1 Condições de cultivo	35
4.2.2 Extração de DNA.....	35
4.2.3 Determinação da presença dos genes de virulência.....	36
4.2.4 Condições de ensaio da PCR.....	37
4.2.5 Visualização dos produtos da PCR.....	39
4.2.6 Sequenciamento de DNA	39
4.3 ENSAIOS BIOLÓGICOS	40
4.3.1 Hemólise.....	40
4.3.2 Citotoxicidade.....	41
4.3.3 Tratamento estatístico.....	42
5 RESULTADOS.....	43
5.1 ENSAIOS MOLECULARES.....	43
5.1.1 Perfil de virulência das estirpes de <i>Aeromonas</i> spp.	44
5.1.2 Sequenciamento dos amplicons.....	55
5.2 ENSAIOS BIOLÓGICOS	59
5.2.1 Ensaio de hemólise	59
5.2.1.1 Padronização do melhor tempo de cultura bacteriana.....	59
5.2.1.2 Padronização do melhor tempo de contato dos eritrócitos com as culturas de <i>Aeromonas</i>	60

5.2.1.3 Hemólise induzida pela cultura de estirpes de <i>Aeromonas</i>	61
5.2.1.4 Hemólise induzida pelos sobrenadantes das culturas de <i>Aeromonas</i>	62
5.2.2 Ensaio de citotoxicidade	67
5.2.2.1 Avaliação do potencial citotóxico das estirpes de <i>Aeromonas</i> sobre a linhagem celular HRT-18	67
6 DISCUSSÃO	71
6.1 ENSAIO GENOTÍPICO	71
6.2 ENSAIOS FENOTÍPICOS	80
7 CONCLUSÕES	84

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Aeromonas* compreende bacilos gram-negativos anaeróbios facultativos, catalase e oxidase positivos, capazes de fermentar a glicose e outros carboidratos. Podem ocorrer isolados, aos pares ou raramente em pequenos grupos. O teor de CG (citosina/guanidina) varia entre 57 a 63%. Geralmente são móveis e apresentam flagelos polares. Crescem na ausência de cloreto de sódio, em temperatura mínima de 0°C a 5°C e máxima de 38°C a 41°C, e em pH de 5,5 a 9,0. São resistentes ao agente vibriostático 0129 (2,4 diamino-6,7-di-isopropil-pteridina) Podem produzir citotoxinas, enterotoxinas, proteases, adesinas e quitinase. (HORNEMAN, ALI e ABBOTT, 2007).

O gênero *Aeromonas* foi criado em 1943, e essas bactérias foram subdivididas em dois grandes grupos com base na temperatura ótima de crescimento desses organismos. O grupo das mesófilas compreende bactérias móveis, com temperatura ótima de crescimento entre 35°C a 37°C, e que foram associadas com uma variedade de infecções em humanos. O grupo das psicrófilas é constituído por bactérias que causam doenças em peixes, são imóveis, e apresentam crescimento ótimo em temperaturas entre 22°C a 25°C (HORNEMAN, ALI e ABBOTT, 2007; JANDA e ABBOTT, 2010).

As bactérias do gênero *Aeromonas* estão presentes em diversos habitats aquáticos, incluindo água mineral, água potável, água salobra, esgoto e rios (ARAUJO et al., 1991; DI BARI, 2007; EVANGELISTA-BARRETO et al. 2010; COELHO et al. 2010). Essas bactérias também já foram isoladas de vários tipos de alimentos, como peixes, frutos do mar, aves, ovos, carne bovina e suína e seus derivados, saladas, sorvete, leite e derivados, frutas e legumes frescos inclusive brócolis, couve-flor, alface, espinafre, cenoura (ARAÚJO et al., 2002; MARTINS, MARQUEZ e YANO, 2002; EVANGELISTA -BARRETO et al., 2006; CARNEIRO e ROSSI JUNIOR, 2006; KINGOMBE et al., 2010).

As bactérias do gênero *Aeromonas* podem causar uma variedade de infecções em humanos, e estas geralmente estão associadas com a ingestão de água (KHAJANCHI et al., 2010) e alimentos contaminados, ou contato com

água contaminada (CHOPRA e HOUSTON, 1999; ALAVANDI e ANANTHAN, 2003; GARIBAY et al., 2006).

As doenças bacterianas de origem alimentar têm aumentado nos últimos anos. Além das causadas por bactérias patogênicas clássicas, está havendo um aumento do número de casos provocados por outras bactérias que normalmente não são investigadas em laboratórios clínicos, entre elas estão as *Aeromonas* (CARNEIRO e ROSSI JUNIOR, 2006). Entretanto esses micro-organismos ainda são pouco conhecidos, o que dificulta o seu isolamento e identificação no laboratório clínico.

As bactérias do gênero *Aeromonas* tem sido alvos de muitos estudos envolvendo a sua taxonomia complicada e a produção de fatores relacionados com virulência. O estudo dos genes que codificam os fatores de virulência é de grande importância para esclarecer o processo de patogênese das *Aeromonas* (JANDA, 1991, PABLOS et al., 2010; LI et al., 2011; OTTAVIANI et al., 2011).

Considerando a ampla distribuição de *Aeromonas* na natureza, as formas de transmissão, e a sua importância como patógeno, este trabalho visa determinar características de virulência presentes em *Aeromonas* spp isoladas no Paraná, a partir de amostras clínicas humanas, contribuindo para aumentar o conhecimento sobre essas bactérias.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 TAXONOMIA

Devido à sua complexidade genética, o gênero *Aeromonas* sofreu diversas mudanças taxonômicas. Na 7ª Edição do “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology” o gênero *Aeromonas* pertencia à família *Pseudomonadaceae*, e na 8ª edição foi reclassificado na família *Vibrionaceae*.

Ensaio moleculares demonstraram que as espécies de *Aeromonas* divergiam filogeneticamente das espécies dos demais gêneros da família *Vibrionaceae*. Com base nessas observações COLWELL, MACDONELL e LEY (1986) propuseram que as espécies de *Aeromonas* fossem agrupadas em uma família à parte. Atualmente as *Aeromonas* são classificadas no domínio *Bacteria*, filo *Proteobacteria*, classe *Gammaproteobacteria*, ordem *Aeromonadales*, família *Aeromonadaceae* e gênero *Aeromonas* (EUZÉBY, <http://www.bacterio.cict.fr/>).

Análises moleculares revelaram a existência de múltiplos grupos de hibridização (HGs) dentro de cada uma das espécies mesofílicas conhecidas (*A. hydrophila*, *A. sobria* e *A. caviae*)(JANDA, 1991). Os termos fenoespécie e genomoespécie passaram a ser utilizados para se referir às *Aeromonas*. O primeiro é utilizado para descrever um conjunto de estirpes que possuem características fenotípicas semelhantes, agrupadas em uma determinada espécie através da realização de testes bioquímicos que as diferenciam das outras espécies. O termo genomoespécie (grupo de hibridização) refere-se a estirpes com características genéticas semelhantes. Estas são identificadas através da hibridização DNA-DNA, e estirpes que apresentam $\geq 70\%$ de homologia de DNA genômico e diferença inferior ou igual a 5°C de ΔT_m são classificadas como pertencentes à mesma espécie (MARTIN-CARNAHAN e JOSEPH, 2005).

Atualmente 25 espécies de *Aeromonas* e 17 grupos de hibridização são conhecidos (PARKER e SHAW 2011).

Em recente revisão, foi apresentada uma proposta simplificada para a classificação das espécies de *Aeromonas* e considerada a sua importância clínica (Tabela 1).

TABELA 1 – ESPÉCIES VÁLIDAS E PROPOSTAS NO GÊNERO *AEROMONAS*

Espécie (ano) ^a	Subespécies	Significado Clínico	Outros nomes (ano) ^b
<i>A. hydrophila</i> (1943)	5	Sim	
<i>A. salmonicida</i> (1953)	5	Sim	
<i>A. sobria</i> (1981)		Não	
<i>A. media</i> (1983)		Sim	
<i>A. caviae</i> (1984)		Sim	<i>A. punctata</i> (1957)
<i>A. veronii</i> (1988)	0 ^c	Sim	<i>A. ichthiosmia</i> (1991)
<i>A. eucrenophila</i> (1988)		Não	
<i>A. schubertii</i> (1989)		Sim	
<i>A. jandaei</i> (1992)		Sim	
<i>A. trota</i> (1992)		Sim	<i>A. enteropelogenes</i> (1991)
<i>A. encheleia</i> (1995)		Não	HG 11
<i>A. bestiarum</i> (1996)		Sim	
<i>A. popoffii</i> (1997)		Sim	
<i>A. simiae</i> (2004)		Não	
<i>A. molluscorum</i> (2004)		Não	
<i>A. bivalvium</i> (2007)		Não	
<i>A. aquariorum</i> (2008)		Não*	
<i>A. tecta</i> (2008)		Sim	
<i>A. allosaccharophila</i> 1992)		Não	<i>A. veronii</i>
<i>A. culicicola</i> (2002)		Não	<i>A. veronii</i>
<i>A. sharmana</i> (2006)		Não	

FONTE: modificado de JANDA e ABBOTT (2010)

NOTA: ^a O número entre parêntesis indica o ano da proposta do nome válido da espécie. ^b outros nomes encontrados na literatura. ^c nenhuma subespécie, mas duas biovariedades (*veroni* e *sobria*). *Há controvérsias, uma vez que recentemente estirpes de *A. aquariorum* foram isoladas de amostras clínicas (sangue e fezes) (FIGUERAS et al., 2009).

Além das espécies citadas por JANDA e ABBOTT (2010), quatro novas espécies foram propostas em 2010, sendo elas *A. diversa*, *A. fluvialis*, *A. taiwanensis* e *A. sanarellii*. Destas *A. diversa*, *A. taiwanensis* e *A. sanarellii* possuem significado clínico, sendo isoladas de feridas (PARKER e SHAW 2011).

Vários estudos epidemiológicos indicam que dos 17 grupos de hibridização (HG) de *Aeromonas* três, respectivamente HG1 (*A. hydrophila*), HG4 (*A. caviae*) e HG 8 (*A. veronii* biotipo *sobria*), representam mais de 85% dos isolados recuperados a partir de material clínico. As razões pelas quais estes três HGs predominam em amostras clínicas são desconhecidas, embora isso possa ser devido à frequência e distribuição ambiental ou a

patogenicidade relativa dessas bactérias para o ser humano (JANDA, 1991; MARTIN-CARNAHAN e JOSEPH, 2005).

2.2 HABITAT E FORMAS DE TRANSMISSÃO

Bactérias do gênero *Aeromonas* apresentam uma distribuição mundial e tem sido isoladas e identificadas a partir de amostras de água, alimentos e de amostras clínicas de humanos (ALBERT et al., 2000; ARAUJO et al., 2002; SEN e RODGERS, 2004; TSAI et al., 2009). São encontradas em praticamente todos os ambientes aquáticos, como rios, lagos, lagoas de água salgada, águas salobras, águas subterrâneas, águas residuais e de esgoto em vários estágios de tratamento, também em ambientes marinhos, mas somente em águas contendo pouco sal. As concentrações de *Aeromonas* encontradas nesses lugares variam de menos de 1UFC/ml em água potável e água do mar, até 10^8 ou mais UFC/ml em esgoto bruto ou lodo de esgoto doméstico (GARIBAY et al., 2006; SNOWDEN et al., 2006; HORNEMAN, ALI e ABBOTT, 2007; EVANGELISTA-BARRETO et al., 2010; JANDA e ABBOTT, 2010; KHAJANCHI et al., 2010).

Devido a sua ampla distribuição no ambiente aquático, o gênero vem sendo considerado como um importante contaminante de águas e associado com doenças de veiculação hídrica (DI BARI et al., 2007; KIVANC, YILMAZ e DEMIR, 2011).

Aeromonas podem ser isoladas a partir de praticamente todos os nichos ambientais onde existem ecossistemas bacterianos, incluindo animais domésticos, espécies de invertebrados, aves, insetos e carrapatos, e os solos naturais, embora existam poucas investigações sobre este último. O vasto número de fontes ambientais a partir das quais *Aeromonas* podem ser encontradas contribui para uma constante exposição e interações entre essas bactérias e os seres humanos (HORNEMAN, ALI e ABBOTT, 2007; JANDA e ABBOTT, 2010).

Bactérias do gênero *Aeromonas* já foram isoladas de vários tipos de alimentos, como peixes, frutos do mar, aves, ovos, carne bovina e suína e seus

derivados, vegetais, saladas, sorvete, leite e derivados (ARAÚJO et al., 2002; MARTINS, MARQUEZ e YANO, 2002; EVANGELISTA -BARRETO et al., 2006; CARNEIRO e ROSSI JUNIOR, 2006). Uma alta porcentagem de *Aeromonas* spp foi detectada em alface, rúcula, queijo, salame, presunto cru e sorvetes. *A. hydrophila* foi a espécie mais comumente isolada de alimentos de origem animal, enquanto *A. caviae* foi a espécie dominante nos vegetais (VILLARI et al., 2000).

As infecções podem ser adquiridas na comunidade através da ingestão de alimentos e água contaminada, mas também por contato direto com água contaminada como, por exemplo, durante atividades recreativas como passeio de barco, pesca e mergulho que podem levar a infecção através de traumas grandes ou pequenos (JANDA e ABBOTT, 2010). KHAJANCHI e colaboradores (2010) analisando estirpes de *Aeromonas* isoladas de amostras clínicas e de água verificaram que além de possuírem os mesmos genes de virulência também apresentaram padrões de PFGE (Pulsed Field Gel-Electrophoresis) indistinguíveis. Isto confirma que a água é uma fonte de transmissão dessas bactérias.

2.3 CULTIVO E IDENTIFICAÇÃO

Aeromonas clinicamente importantes são capazes de crescer em diversos meios de cultura comuns utilizados nos laboratórios, com algumas exceções como o ágar de tiosulfato-citrato-sais biliares-sacarose (TCBS). Podem ser utilizados os meios MacConkey, XLD, HE, SS. O ágar sangue com 20 µg de ampicilina/ml é utilizado para isolar *Aeromonas*, exceto *A. trota* a qual é intrinsicamente suscetível a ampicilina, e uma porcentagem de 15 a 57% de *A. caviae*. O meio CIN (cefsulodina-irgasan-novobiocina) também é um meio excelente para o isolamento de *Aeromonas* cujas colônias apresentam um centro rosa e são morfologicamente indistinguíveis da *Yersinia enterocolitica*.

Aeromonas spp podem apresentar-se como lactose positiva ou negativa em ágar MacConkey. A fermentação da lactose é um interferente à realização da prova da oxidase, uma vez que com a conseqüente diminuição do pH do

meio para 5,1-5,2, ocorre inibição da reação da oxidase, um teste bioquímico importante para a detecção de *Aeromonas* spp (MISHRA, 1987, HUNT et al., 1981).

Um meio alternativo para o isolamento dessas bactérias é o ágar AA (Ágar *Aeromonas*) que contém D-xilose como elemento diferencial (*Aeromonas* não fermentam esse carboidrato), e como agentes seletivos o verde brilhante e o irgasan que permitem o crescimento de *Aeromonas* susceptíveis a penicilina. O teste da oxidase pode ser feito diretamente a partir das colônias do meio onde não há a produção de ácido a partir da D-xilose pela flora fecal. *Aeromonas* são oxidase-positiva e suas colônias ficam rosa translúcidas (ANDELOVA; PORAZILOVA; KREJCI, 2006; JANDA e ABBOTT, 2010).

A identificação de *Aeromonas* ao nível de espécie é uma prática desafiadora, e poucos laboratórios clínicos são capazes de identificar essas bactérias além de complexos ou grupos (JANDA e ABBOTT, 2010). São reconhecidos 3 complexos de *Aeromonas*: complexo *A. hydrophila* que contém as espécies *A. hydrophila*, *A. bestiarum*, *A. salmonicida*; o complexo *A. caviae* composto por *A. caviae*, *A. media*, *A. eucrenophila*, e o complexo *A. sobria* que contém as espécies *A. veronii* (HG8), *A. jandaei*, *A. schubertii* e *A. trota* (ABBOTT; CHEUNG; JANDA, 2003; HORNEMAN, ALI e ABBOTT, 2007).

Aeromonas spp. podem ser facilmente confundidas com outros fermentadores oxidase positiva, como *Vibrio* e *Plesiomonas* (JANDA, 1991), por isso o uso de reações chave é necessário para evitar a identificação errônea dos isolados. Essas incluem crescimento em caldo nutriente na presença ou ausência de NaCl, onde a incapacidade de crescer em concentrações de sal maiores que 6% usualmente indica o gênero *Aeromonas*; resistência ao agente vibriostático O/129 (2,4-diamino-6,7-diisopropilpteridina), “string” teste e cultivo em ágar tiosulfato-citrato-sais biliares-sacarose (ABBOTT et.al., 1998; HORNEMAN, ALI e ABBOTT, 2007).

Entretanto a identificação das estirpes de *Aeromonas* ao nível de espécie apresenta dificuldades incluindo uma taxonomia complicada e o uso de testes bioquímicos não convencionais que são muitas vezes demorados e difíceis de interpretar (JANDA, 1991; ABBOTT; CHEUNG; JANDA, 2003). Além disso, os sistemas comerciais automatizados ou semi-automatizados não identificam *Aeromonas* de forma satisfatória (OVERMAN, 1985; JANDA, 1991;

ABBOTT et al., 1998; SUREK et al., 2010). Outra dificuldade associada com essas bactérias é que algumas estirpes apresentam propriedades bioquímicas atípicas dificultando a sua identificação (JANDA, 1991; ABBOTT; CHEUNG; JANDA, 2003).

Uma alternativa para a identificação das *Aeromonas* é a utilização de ensaios moleculares. A metodologia baseada no Polimorfismo de Tamanho de Fragmento de Restrição (RFLP) do gene 16S rDNA tem sido usada para esta finalidade e permite uma identificação rápida e confiável de *Aeromonas* spp. (BORRELL et al., 1997). Outro método eficaz é o seqüenciamento dos genes *gyrB* e *rpoB* (que codificam subunidade beta da DNA girase e da RNA polimerase, respectivamente) (ARAVENA-ROMAÍN et al., 2011).

Um novo método, rápido e menos dispendioso que vem sendo aplicado na identificação de *Aeromonas* é a espectrometria de massa tipo MALDI-TOF. Possui uma acurácia de 100% na identificação ao nível de gênero e 91,4% ao nível de espécie (LAMY et al., 2011).

2.4 INFECÇÕES CAUSADAS POR *AEROMONAS*

O gênero *Aeromonas* é capaz de causar uma série de infecções em humanos variando de uma gastroenterite aguda não complicada até condições com risco de vida do paciente como a septicemia.

Pelo menos 10 espécies de *Aeromonas* foram associadas com doenças em humanos, mas as de maior importância clínica são *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. veronii* biotipo sobria, responsáveis pela grande maioria (85%) das infecções humanas causadas por bactérias deste gênero (DEODHAR, SARASWATHI e VARUDKAR, 1991; JANDA e ABBOTT, 1998; CHOPRA e HOUSTON, 1999; GUERRA et al., 2007).

2.4.1 Gastroenterite

As gastroenterites provocadas por *Aeromonas* spp podem variar de diarreias agudas em crianças, a diarreias crônicas em adultos que podem persistir por semanas em pacientes não tratados (MOYER, 1987).

Formas clinicamente mais severas também podem ocorrer, com presença de sangue nas fezes, manifestações similares à cólera (CHOPRA e HOUSTON, 1999; JANDA e ABBOTT, 2010), ou como diarreia do viajante (VILA et al., 2003). Mas a apresentação mais comum da gastroenterite causada por *Aeromonas* é a enterite secretória e as principais queixas são febre baixa e dor abdominal. A forma disentérica é menos comum e os sintomas incluem cólicas abdominais, dor, muco e sangue nas fezes, e essa forma requer hospitalização (CHOPRA e HOUSTON, 1999; VILA et al., 2003; JANDA e ABBOTT, 2010).

Provavelmente o papel mais valorizado que *Aeromonas* apresenta em casos de gastroenterites bacterianas é a diarreia subaguda que pode perdurar por períodos de 2 semanas a 2 meses, e a crônica com duração de mais de 2 meses. Os sintomas são inespecíficos e normalmente incluem múltiplas evacuações líquidas por dia, por vezes acompanhados pela perda de peso significativa ao longo do tempo. Na diarreia do viajante o período de incubação é de 1 a 2 dias, e enterite secretória é a apresentação clínica mais comum, embora gastroenterite inflamatória também possa ocorrer, bem como a diarreia persistente ou crônica. A complicação mais grave que pode resultar de uma gastroenterite por *Aeromonas* é a síndrome hemolítica urêmica, mas também um caso fulminante de gastroenterite necrotizante associada a graves lesões em tecido mole, septicemia e falência de múltiplos órgãos já foi relatada (CHOPRA e HOUSTON, 1999; JANDA e ABBOTT, 2010)

A transmissão de *Aeromonas* spp nos casos de gastroenterites ocorre basicamente através da água (DAILY et al., 1981, KHAJANCHI et al., 2010) e de alimentos contaminados, e ocorre predominantemente durante os meses quentes do ano. Uma provável explicação para esse fato é que as *Aeromonas* mesófilas crescem otimamente em água em temperaturas elevadas, levando a um aumento da concentração dessas bactérias em ambientes de água doce e

em abastecimentos de água para uso doméstico. A mesma sazonalidade é observada em infecções extra-intestinais (JANDA e ABBOTT, 2010).

A. hydrophila, *A. caviae* e *A. veronii* biotipo sobria são as espécies de *Aeromonas* predominantes nos casos de diarreia (JANDA, 1991). Alguns estudos indicam que crianças de 6 meses a 5 anos constituem a principal faixa etária acometida pela diarreia causada por *Aeromonas*, e que estirpes citotoxigênicas parecem predominar em indivíduos com mais de 50 anos de idade (JANDA, 1991; CHOPRA e HOUSTON, 1999; ALBERT et al., 2000).

Nos países industrializados a frequência de *Aeromonas* em amostras de fezes varia de 2,2% a 10% (MOYER, 1987; PAZZAGLIA et al., 1991; JANDA e ABBOTT, 2010).

No Brasil as amostras de fezes de pacientes com gastroenterite não são analisadas rotineiramente para a presença de *Aeromonas*, mas alguns estudos mostram que essas bactérias são causas importantes de diarreia em nosso meio.

No ano de 2004, em Pernambuco, foi registrado um surto de diarreia associado com *Aeromonas*. Cerca de 2000 pessoas foram afetadas pela doença e, entre as 582 coproculturas realizadas, 145 (25%) revelaram um enteropatógeno bacteriano, destacando-se 114 casos (~20%) dos quais *Aeromonas* foi isolada, em contraste com os 31 (5%) associados com as etiologias clássicas (*V. cholerae* O1, *Salmonella*, *Shigella*, incluindo *V. cholerae* não O1/não O139) (HOFER et al., 2006). Este relato mostra o potencial de *Aeromonas* para causar grandes surtos, e a sua importância como agente etiológico de diarreia no país.

GUERRA e colaboradores (2007) detectaram uma prevalência de 6.6% de *Aeromonas* no Rio Grande do Sul, em pacientes internados devido a doenças diarreicas. A maior prevalência foi observada em lactentes e crianças entre 1 e 2 anos de idade. As espécies isoladas foram *A. hydrophila* (51.8%), *A. caviae*, (40.8%) e *A. veronii* sobria (7.4%).

A cultura de swab retal de neonatos hospitalizados com sintomas de diarreia aguda em um hospital do Rio de Janeiro revelou a presença *A. caviae* (42,8%), *A. media* (25%) e *A. veronii* biogrupo sobria (10,7%) (PEREIRA et al., 2008).

No Paraná foi detectada uma frequência de 2,6% de *Aeromonas* em pacientes com diarreia. Essas bactérias foram encontradas em crianças e adultos, e a espécie mais frequente foi *A. caviae* (SUREK et al., 2010).

Esses estudos demonstram que a prevalência de *Aeromonas* é semelhante a de outros patógenos entéricos como *E. coli*, *Shigella* e *Campylobacter* (PARKER e SHAW, 2011).

2.4.2 Septicemia

Não existem características clínicas distintas entre septicemia causada por *Aeromonas* e aquelas causadas por outras bactérias gram negativas. O que pode ajudar o clínico a suspeitar de sepse por *Aeromonas* é a história do paciente citando contato com água doce ou profissões associadas com esses ambientes; um segundo indicador é a presença de um ectima gangrenoso como lesões em forma de petéquias ou bolhas como consequência da bacteremia (JANDA e ABBOTT, 2010).

Pessoas imunodeprimidas, com doenças mieloproliferativas, ou doença crônica do fígado apresentam maior risco de desenvolver septicemia por *Aeromonas*. Outras condições clínicas subjacentes têm sido associadas com risco para septicemia causada por *Aeromonas* tais como, hepatite, problemas renais, anomalias cardíacas e várias outras condições hematológicas, incluindo anemia aplástica, talassemia, mieloma múltiplo e macroglobulinemia de Waldenstrom (FUNADA e MATSUDA, 1997; MENCACCI et al., 2003; JANDA e ABBOTT 2010).

Além desses, um pequeno mas crescente grupo de pacientes tem desenvolvido bacteremia causada por *Aeromonas* sem apresentar fatores de risco reconhecidos para a infecção, e sem grandes traumas ou eventos reconhecidos associados com a introdução destes organismos no sistema circulatório. A taxa de mortalidade em casos de septicemia causados por *Aeromonas* é de 33% ou mais (JANDA e ABBOTT, 2010; DWIVEDI et al., 2008).

2.4.3 Pele e tecidos moles

O segundo local anatômico mais comum a partir do qual *Aeromonas* são isoladas inclui o tegumento e os tecidos moles, podendo ocorrer infecções dos tecidos subcutâneos (celulite), e também processos que envolvem as camadas mais profundas da pele e tecidos subcutâneos, causando graves danos ao tecido muscular (mionecrose). Mais de 90% das infecções de feridas causadas por *Aeromonas* são adquiridas na comunidade e ocorrem em pessoas com mais de 10 anos de idade. Os locais do corpo mais frequentemente afetados incluem as mãos, pés, braços e pernas. Simples abrasões ou lacerações podem levar à doença significativa (AVOLIO et al., 2009; GUANASEKARAN et al., 2009). Também mordeduras de animais ou a introdução de corpos estranhos (terra, madeira, ou metal) contendo *Aeromonas* e acidentes que produzem fraturas teciduais expostas e lesão muscular, são um terreno fértil para infecções por *Aeromonas* (JANDA e ABBOTT, 2010). Traumas cutâneos devido ao diabetes associados com exposição à água contaminada também são fatores que podem predispor a infecção (AVOLIO et al., 2009).

A exposição à lama pode ser uma fonte de infecção de pele por *Aeromonas* como descrito em pacientes que participaram de uma competição de “futebol de lama” na Austrália e desenvolveram doença causada *A. hydrophila* (VALLY et al., 2004).

2.4.4 Infecções intra-abdominais

Essas infecções incluem pancreatite, colangite aguda e abscesso hepático, bem como peritonite (CHOI et al., 2008; JANDA e ABBOTT, 1998, 2010). Colangite supurativa aguda é a complicação hepatobiliar mais comumente associada com *Aeromonas*. Praticamente todos os pacientes com colangite associada com *Aeromonas* possuem várias condições subjacentes como colelitíase, coledocolitíase, colangiocarcinoma, carcinoma pancreático ou estenose biliar não maligna (JANDA e ABBOTT, 1998, 2010).

Peritonite por *Aeromonas* pode apresentar-se como consequência da diálise peritoneal ambulatorial contínua. Em muitos casos esses pacientes possuem doença hepática subjacente (por exemplo, adenocarcinoma ou hepatite), que pode ou não ser reconhecida no momento da infecção. Na maioria a fonte de infecção não é muito clara, mas parece estar associada com a ingestão de peixes de água doce (JANDA e ABBOTT, 2010).

2.4.5 Infecção do trato respiratório

No passado se acreditava que *Aeromonas* apenas era capaz de colonizar o trato respiratório, porém hoje se sabe que a pneumonia pode ser causada por essas bactérias (ENDER e DOLAN, 1997; JANDA e ABBOTT, 1998, 2010; NAGATA et al., 2011). *A. hydrophila* é a espécie de *Aeromonas* mais frequentemente isolada de casos de pneumonia. A taxa de mortalidade é de aproximadamente 50% (REINES e COOK, 1981).

A. hydrophila foi associada com pneumonia, empiema e a formação de abscessos pulmonares. A infecção pode ser adquirida pelo contato com um ambiente aquático contaminado ou pela propagação da bactéria do trato gastrointestinal para o respiratório (BRAVO et al., 2003).

2.4.6 Outras infecções associadas com *Aeromonas*

Vários outros tipos de infecção podem ser causados por *Aeromonas*, incluindo doença ocular, infecções dos ossos, e infecções do trato urogenital (ITU).

ITU pode ser ocasionalmente causada por bactérias do gênero *Aeromonas*, e as espécies *A. veronii* bv. sobria (SANCHEZ-CESPEDES et al., 2009; JANDA e ABBOTT, 2010), *A. popoffii* (HUA et al., 2004) e *A. caviae* (AL-BENWAN, et al., 2007) tem sido implicadas como agentes dessas infecções.

Espécies de *Aeromonas* podem causar doenças oculares que vão desde endoftalmite a ceratite e ulceração da córnea. Lentes de contato gelatinosas foram a fonte de *Aeromonas* em alguns dos casos de infecção (PINNA et al., 2004; SOHN et al., 2007; JANDA e ABBOTT, 2010).

Osteomielite é outra infecção que também já foi associada com *Aeromonas*, incluindo estirpe resistente a múltiplos antibióticos (GÓMEZ-GARCÉS et al., 2011).

Outras infecções causadas por *Aeromonas* podem resultar de picadas de várias espécies de animais, caracterizando infecções zoonóticas. Isto se deve à presença de *Aeromonas* na microbiota da orofaringe de répteis e serpentes em particular (JANDA e ABBOTT, 2010).

2.5 FATORES DE VIRULÊNCIA

Virulência, ou patogenicidade, é a habilidade de uma bactéria causar infecção (CASADEVALL e PIROFSKI, 1999; SALYERS e WHITT, 2002). Fator de virulência (ou mecanismo de patogenicidade ou mecanismo de virulência) denota um produto ou estratégia bacteriana que contribui para a virulência. Algumas características tais como a habilidade de aderir às células das mucosas ou produzir toxinas, tem uma relação clara e direta com o processo de infecção. Outros, como a capacidade de obter energia a partir da fermentação de carboidratos são considerados como funções essenciais ao invés de fatores de virulência, mesmo que a habilidade de uma bactéria em obter fontes de carbono, nitrogênio e energia no corpo humano seja essencial para o desenvolvimento da infecção. O conceito de que a produção de alguns poucos fatores de virulência são suficientes para explicar porque algumas bactérias podem causar doença e outras não, é uma simplificação da natureza complexa da interação entre a bactéria e seu hospedeiro (SALYERS e WHITT, 2002).

É evidente que a virulência na maioria das espécies é de natureza poligênica, requerendo dois ou mais genes atuando em conjunto de forma atualmente ainda pouco conhecida para a maioria dos patógenos. Com base

no conhecimento sobre a patogênese de bactérias gram negativas pode-se dizer que a virulência de *Aeromonas* é de origem poligênica ou multifatorial, envolvendo uma complexa interação entre as bactérias e o hospedeiro (JANDA, 1991; JANDA e ABBOTT, 2010, PABLOS et al., 2010).

Um enteropatógeno deve penetrar no hospedeiro, escapar das barreiras fisiológicas, encontrar um nicho adequado e evitar os mecanismos de defesa do hospedeiro para produzir doença. Uma vez que *Aeromonas* penetra no hospedeiro, via água ou alimento contaminados, uma série de eventos devem ocorrer de modo a escapar do pH ácido do estômago, competir com a microbiota e se estabelecer no intestino e causar doença. Este processo envolve uma série de passos inter-relacionados, incluindo motilidade, ligação ao epitélio gastrointestinal, colonização e a elaboração de fatores de virulência e infecção (JANDA e ABBOTT, 2010).

A patogênese da infecção de *Aeromonas* é complexa e vários fatores de virulência estão envolvidos.

2.5.1 Toxinas

Aeromonas são capazes de produzir uma série de produtos com atividade toxigênica tais como enterotoxinas, citotoxinas, aerolisinas e hemolisinas (SINGH e SANYAL, 1992; WONG, HEUZENROEDER e FLOWER, 1998; CHOPRA e HOUSTON, 1999; MARTINS, MARQUEZ e YANO, 2002).

2.5.1.1 Hemolisinas

As proteínas com atividade hemolítica são importantes para o potencial patogênico das *Aeromonas* (WANG et al., 2003).

Aeromonas podem produzir vários tipos de alfa e beta-hemolisinas. As primeiras produzem efeitos citotóxicos reversíveis e lise incompleta de eritrócitos, enquanto as beta-hemolisinas produzem poros na membrana celular

causando destruição completa de eritrócitos (GALINDO et al., 2006). As beta-hemolisinas são mais importantes para a virulência de *Aeromonas*. Embora vários tipos destas toxinas tenham sido descritos, três estão melhor caracterizadas: a aerolisina (*aerA*), a enterotoxina citolítica (*aer*) e a hemolisina (*hly*).

A aerolisina de *A. hydrophila* (*aerA*) foi identificada em 1970 por BERNHEIMER e colaboradores (1974), e mais tarde purificada (BUCKLEY et al., 1981), e o gene codificador seqüenciado (HOWARD et al., 1987). É secretada como um precursor inativo, denominado proaerolisina. A proaerolisina é uma proteína de 470 aminoácidos, altamente solúvel, e com massa molecular de 52 KDa (FIVAZ et al., 2001).

Ao invés de reconhecer um receptor específico na superfície das células alvo, esta toxina interage com várias proteínas entre elas, uma glicoproteína de 47KDa de eritrócitos e Thy1 de linfócitos T. Uma característica comum entre essas proteínas é uma âncora glicosilfosfatidilinositol (GPI), que parece ser determinante para a ligação da toxina (ROSSJOHN, FEIL e MCKINSTY, 1998). O precursor proaerolisina é ativado proteoliticamente, no intestino em solução por enzimas digestivas, ou na superfície celular pela furina, uma endoprotease transmembrana de mamíferos. A aerolisina ativada oligomeriza formando uma estrutura em anel capaz de se inserir na membrana da célula eucariótica e formar poros transmembrana, provocando uma série de eventos intracelulares os quais evoluem para a morte celular (FIVAZ et al., 2001).

Um segundo tipo de β -hemolisina é a HlyA, encontrada em muitas espécies de *Aeromonas*. Parece ser comum em estirpes de *A. hydrophila*, e menos frequente em *A. caviae* (35%), *A. veronii* (12%), *A. trota*, e *A. jandaei* (HEUZENROEDER, WONG e FLOWER, 1999; JANDA e ABBOTT, 2010). HlyA foi inicialmente isolada de *A. hydrophila* A6, apresenta 621 aminoácidos e massa de 69 KDa. A seqüência de aminoácidos apresenta homologia de 89% com a hemolisina AHH1 de *A. hydrophila* ATCC 7966 e 51% de identidade com a hemolisina HlyA de *V. cholerae* (WONG, HEUZENROEDER, FLOWER 1998).

Outra toxina com atividade hemolítica encontrada em *Aeromonas* é a enterotoxina citolítica (*aer*), com uma massa molecular de 52 KDa. Apresenta homologia de 76 e 79% respectivamente, com as sequencias de DNA e

aminoácidos da aerolisina de *A. sobria* Ah2, e de 89 e 93% respectivamente, com a aerolisina de *A. hydrophila*. Esta toxina apresenta várias atividades biológicas. Além da atividade citolítica e letalidade para camundongos, relatadas originalmente para a aerolisina, esta toxina do tipo aerolisina também apresenta atividade enterotóxica, e é neutralizada por anticorpos monoclonais produzidos para a aerolisina (CHOPRA et al., 1993).

2.5.1.2 Enterotoxinas

Entre os vários fatores de virulência produzidos por *Aeromonas* as enterotoxinas são as mais importantes para o desenvolvimento de diarreia. Duas categorias de enterotoxinas já foram descritas, a citotóxica e a citotônica.

A enterotoxina citotóxica (Act) é uma toxina formadora de poros codificada pelo gene *act*. É um dos fatores de virulência mais potentes de *Aeromonas*, e apresenta atividade hemolítica, citotóxica e enterotóxica (FERGUSON et al., 1997; CHOPRA e HOUSTON, 1999; SHA et al., 2005; GALINDO et al., 2006) e é letal para camundongos quando injetada via intravenosa (CHOPRA e HOUSTON, 1999). É denominada beta-hemolisina e/ou aerolisina por alguns autores (CHOPRA E HOUSTON 1999; CHOPRA et al., 2000; CASTRO-ESCARPULLI et al., 2002) causando considerável confusão na literatura. Embora o gene *act* apresente similaridade (79-93%) com dois genes de aerolisina (CHOPRA e HOUSTON, 1999), existem diferenças significativas entre seus produtos, como na composição de aminoácidos, diferenças funcionais e em relação à neutralização por anticorpos e incapacidade de Act em ligar-se ao receptor da aerolisina (FERGUSON et al., 1997).

Há evidências de que a toxina Act exerce seu efeito após a ligação aos receptores na membrana celular, e foi sugerido que o colesterol é o seu receptor (FERGUSON et al., 1997; GALINDO et al., 2006).

Act está relacionada com infecções em humanos principalmente as gastroenterites (XU et al., 1998), induz o acúmulo de líquido em alças intestinais e estimula respostas pró-inflamatórias pelo aumento da produção de

citocinas, fator de necrose tumoral, IL-1 e IL-6 (CHOPRA et al., 2000; GALINDO et al., 2004; JANDA e ABBOTT, 2010). Causa infiltração de macrófagos no intestino de animais, e a ativação dessas células fagocíticas contribui para a secreção de fluidos, inflamação maciça e destruição tecidual (SHA et al., 2002).

Alterações morfológicas intracelulares drásticas e irreversíveis já foram observadas como efeito citotóxico de Act, como vacuolização citoplasmática, condensação da cromatina nuclear, assim como a formação de fragmentos com conteúdo citoplasmático e nuclear (FALCÓN et al., 2004).

As toxinas citotônicas podem provocar secreção de fluidos no intestino delgado, mas não causam degeneração de criptas e vilosidades do intestino delgado (CHOPRA e HOUSTON, 1999).

Várias enterotoxinas citotônicas de massas moleculares distintas foram descritas em *Aeromonas*, mas duas são mais bem conhecidas: uma termo-lábil, inativada pela exposição a 56°C por 20 minutos, causa secreção de fluidos no intestino e não reage cruzado com a antitoxina da cólera; a outra é termo-estável (100°C por 30 minutos), causa acúmulo de fluidos no intestino e reage com a antitoxina da cólera. Essas toxinas foram denominadas Alt e Ast respectivamente, para termo-lábil e termo-estável. Alt é uma proteína de 44 kDa, ao passo que Ast tem uma massa de 71 kDa. Ambas provocam o alongamento em células CHO, causam a secreção de fluidos em alças ileais ligadas de ratos, aumento nos níveis de cAMP e PGE₂ na mucosa intestinal (SHA, KOZLOVA e CHOPRA, 2002; GALINDO et al., 2006).

Alt e Ast, produtos respectivamente dos genes *ast* e *alt*, podem induzir sinergicamente uma diarreia severa. Mas também há sugestões de que isolados positivos para ambos os genes estão associados com diarreia aquosa, enquanto os isolados que são positivos somente para o gene *alt* estão associados com fezes mal formadas (ALBERT et al., 2000).

As enterotoxinas Act, Alt e Ast causam a secreção de fluidos, mas Act é a que apresenta maior atividade, seguida por Alt e Ast. A diarreia sanguinolenta está mais associada com a enterotoxina citotóxica Act, enquanto que a não sanguinolenta está associada com as enterotoxinas citotônicas Alt e Ast. Estudos confirmaram a atividade enterotóxica dos produtos dos genes *act*, *alt* e

ast, através do desenvolvimento de mutantes nesses genes (SHA, KOZLOVA e CHOPRA, 2002).

2.5.1.3 Toxina Shiga

Infecções humanas causadas por *Aeromonas* ocasionalmente têm sido associadas com a síndrome urêmica hemolítica (HUS), uma das principais causas de insuficiência renal aguda provocada principalmente por *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), que se caracterizam pela produção de toxina tipo Stx1 e/ou Stx2. Ambas as Stxs são codificadas pelos genes *stx* presentes no genoma de bacteriófagos lisogênicos de EHEC (FIGUERAS et al., 2007). A presença de toxinas Shiga já foi descrita em algumas estirpes de *Aeromonas* isoladas de gastroenterites, colite hemorrágica e síndrome urêmica hemolítica, e também estão codificadas em genoma de bacteriófagos (ALPERI e FIGUERAS, 2010). Um estudo relatou a presença de Stx1 em *A. caviae* (42,1%), *A. hydrophila* (31,6%) e *A. veronii* (10,5%), espécies comumente associadas com gastroenterite e até mesmo com a síndrome disentérica e síndrome urêmica hemolítica. Também já foi descrita uma estirpe de *A. caviae* positiva para Stx1 e Stx2, isolada de uma amostra de urina. Ao contrário do mostrado acima, PABLOS et al., (2009) não encontraram os genes *stx*₁ e *stx*₂ em isolados de *Aeromonas*, o que sugere que a distribuição desses genes não é muito comum em bactérias pertencentes a esse gênero.

2.5.1.4 Enzimas hidrolíticas

Enzimas hidrolíticas extracelulares como lipase e elastase desempenham um papel importante na patogênese de *Aeromonas* durante a invasão do hospedeiro e no estabelecimento da infecção, pela superação inicial das defesas do hospedeiro e pelo fornecimento de nutrientes para a proliferação celular (ZHU et al., 2007).

O gene da lipase pode ser encontrado em várias estirpes de *Aeromonas*. O gene codificador *lipH3* foi purificado e clonado a partir de um isolado humano de *A. hydrophila* (ANGUITA, APARICIO e NAHARRO, 1993), mas alternativamente esse gene é chamado de *pla*, *lip* e *apl1* (SEN e RODGERS., 2004).

O gene da elastase (*ahpB*) foi clonado a partir de uma estirpe de *A. hydrophila*. Essa protease é considerada como um importante fator de virulência, pois a DL50 (dose letal média) de mutantes *ahpB* de *A. hydrophila* foi 100 vezes maior do que a da estirpe selvagem (CASCON et al., 2000).

2.5.2 Sistema de Secreção Tipo III (T3SS, TTSS)

O sistema de secreção tipo III (TTSS) tem um papel crucial na interação patógeno-hospedeiro. Permite a translocação de proteínas efetoras bacterianas entre as três membranas (duas bacterianas e uma eucariota) em uma única etapa, e a liberação de determinantes de virulência diretamente no citoplasma das células interferindo com e alterando os processos fisiológicos da célula hospedeira. Uma das funções do TTSS seria a de permitir que as bactérias estabeleçam comunicações célula-célula, facilitando assim a persistência e replicação do organismo no hospedeiro. (VILCHES et al., 2004; CHACÓN et al., 2004; PARKER e SHAW, 2011).

O T3SS em geral é formado por uma estrutura cilíndrica chamada de complexo da agulha, que apresenta similaridade com o flagelo (CORNELIS e GIJESSE, 2000). A sequência de DNA que codifica o T3SS de *Aeromonas* compreende 35 genes organizados em uma disposição similar aos de *Pseudomonas aeruginosa* (VILCHES et al., 2004). Os genes *ascF-ascG* e *ascV* codificam proteínas que constituem parte do sistema de secreção tipo III (VILCHES et al., 2008; CHACON et al., 2004).

Mutantes para o gene *ascV* mostraram ser menos virulentos em camundongos, como mostrado pelo aumento (50%) da dose letal, e diminuição da citotoxicidade em diversas linhagens celulares eucarióticas comparando

com a estirpe selvagem (VILCHES et al., 2004), indicando a participação desse sistema na virulência de *Aeromonas*.

O TTSS tem sido detectado tanto em *Aeromonas* isoladas de amostras clínicas como ambientais, com uma menor prevalência nas estirpes ambientais (26%) comparado com as patogênicas (56%). Os genes que codificam o TTSS nas *Aeromonas* mesófilas são de origem cromossomal. A presença de TTSS é mais freqüente em *A. veronii* e *A. hydrophila* (80% das estirpes) que em *A. caviae* (13%) (VILCHES et al., 2004).

2.5.3 Sistema de Secreção Tipo 6

Além do TTSS outro sistema de secreção envolvido na virulência de *Aeromonas*, é o Sistema de secreção tipo 6 (T6SS) (SHA et al., 2005; SUAREZ et al., 2008; SUAREZ et al., 2010). Este sistema é capaz de exportar proteínas efetoras para o meio extracelular ou é capaz de translocá-las no citoplasma da célula hospedeira eucariótica, como o sistema de secreção do tipo 3, porém seu mecanismo de ação ainda é desconhecido (MA et al., 2009; SATCHEL, 2009; PARKER e SHAW, 2011).

O T6SS é composto por 15-25 genes que podem ser divididos em proteínas secretadas e proteínas não secretadas que podem ser componentes do aparato de secreção. Há evidências de uma relação evolutiva entre o T6SS e a maquinaria de perfuração celular dos bacteriófagos, a qual é utilizada para injetar o DNA viral na célula bacteriana. O T6SS é formado por uma estrutura em forma de agulha, que é inserida na membrana da célula alvo e através da qual são liberadas proteínas efetoras (BÖNEMANN, PIETROSIUK e MOGK 2010).

SUAREZ et al., 2008 reportaram pela primeira vez a presença de genes funcionais do T6SS em isolados clínicos de *A. hydrophila*, e também mostraram que o T6SS é um sistema independente do TTSS e do sistema flagelar.

Os genes do T6SS encontrados em *A. hydrophila* apresentaram alta identidade com o *hcp* (71%) e com as proteínas da família Vgr de *V. cholerae*.

Outros genes do T6SS também encontrados em *A. hydrophila* homólogos aos do T6SS de *V. cholerae* são *vasA*, *vasF*, *vasK* e *vasH*. Os genes *vasH* e *vasK* são componentes essenciais do T6SS. O gene *vasH* parece ser um componente necessário para a expressão dos componentes do T6SS, e *vasK* é uma proteína estrutural do T6SS, e *A. hydrophila* mutantes para esses genes são menos virulentos em ratos. A secreção da proteína Hcp foi afetada com a mutação nos genes *vasH* e *vasK* (SUAREZ et al., 2008).

Hcp induz a apoptose em células, e a presença de anticorpos específicos para essa proteína já foi detectada em soro de camundongos infectados com uma dose sub-letal de *A. hydrophila*. Os camundongos foram protegidos de uma infecção posterior por *Aeromonas*, sugerindo que Hcp pode ser um potencial alvo para o desenvolvimento de vacinas (SUAREZ et al., 2008).

O T6SS de *A. hydrophila* está envolvido na inibição da fagocitose, e na citotoxicidade (SUAREZ et al., 2008 e 2010).

2.6 RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS

Nas últimas décadas, um crescente interesse no gênero *Aeromonas* foi observado, uma vez que este grupo de bactérias se tornou um patógeno humano emergente. Uma das razões que pode ter contribuído para isso foram os níveis elevados de resistência antimicrobiana que este patógeno apresenta. (BALASSIANO et al., 2007).

A resistência aos antimicrobianos entre os patógenos entéricos é um problema grave nos países em desenvolvimento onde existe uma elevada frequência das doenças gastroentéricas e muitos antibióticos já não são eficazes devido ao uso inadequado desses medicamentos. A resistência aos antibióticos é particularmente relevante em espécies patogênicas do gênero *Aeromonas* em que, além da resistência clássica aos β -lactâmicos, são isoladas estirpes com múltipla resistência (GOÑI-URRIZA et al., 2000, VILA et al., 2002, 2003, BRAVO et al., 2003).

A principal preocupação em relação à suscetibilidade das *Aeromonas* é a expressão de uma ou mais β lactamases induzíveis com atividade contra uma variedade de β -lactâmicos, incluindo penicilinas, cefalosporinas e cefalosporinas de espectro ampliado. Três classes principais de β -lactamases foram detectadas em *Aeromonas*: cefalosporinas da classe C, penicilinas da classe D e metalo- β -lactamases da classe B (MBL). As estirpes produtoras de β -lactamases apresentam cinco padrões principais: estirpes do complexo *A. hydrophila* expressando as β -lactamases das classes B, C, e D; *A. caviae* expressando β -lactamases das classes C e D; estirpes do grupo *A. veronii* contendo β -lactamases das classes B e D; *A. schubertii* contendo β -lactamases da classe D; e *A. trota* com β -lactamases da classe C, o que parece ser compartilhado com muitas estirpes de *A. veronii* bv sobria. As *Aeromonas* na sua maioria são sensíveis às fluoroquinolonas. (JANDA e ABBOTT, 2010).

Entre todos os antimicrobianos utilizados no tratamento de doenças associadas com *Aeromonas* a tetraciclina é um dos mais importantes (BALASSIANO et al., 2007), entretanto estirpes resistentes a esse antibiótico já foram descritas (CHOPRA e ROBERTS, 2001; SCHMIDT et al., 2001; BALASSIANO et al. 2007).

A maioria das *Aeromonas* isoladas no Paraná apresentou resistência a ampicilina, cefalotina e cefazolina; em algumas das estirpes também foi observada resistência a tetraciclina, cefoxitina, sulfametoxazol-trimetoprim e ácido nalidíxico (SUREK et al., 2010).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar as características de virulência associadas com estirpes de *Aeromonas* isoladas no Paraná.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar a presença de genes de virulência associados com a expressão de:

- Hemolisinas (*aerA*, *hlyA* e *aer*)
- Enterotoxina citotóxica (*act*)
- Enterotoxinas citotônicas (*alt* e *ast*)
- Toxina Shiga (*stx₁* e *stx₂*)
- TTSS (*ascV*, *ascF-ascG*)
- T6SS (*vasH*)
- Hidrolases extracelulares (*lip* e *ela*)

Realizar ensaios biológicos “in vitro” para verificar a presença de atividade hemolítica e atividade citotóxica.

Verificar a distribuição dessas características entre as diferentes espécies de *Aeromonas*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AMOSTRA

Foram estudadas 100 estirpes de *Aeromonas* compreendendo *A. hydrophila* (13), *A. trota* (3), *A. caviae* (63), *A. veronii sobria* (13), e *Aeromonas* spp (8), isoladas a partir de amostras de sangue (1), líquido (1), ferida (3) e fezes (95). Estas bactérias foram previamente isoladas e identificadas (VIZZOTTO, 2008; SUREK et al., 2010; ASSIS, FEA comunicação pessoal) e fazem parte da Bacterioteca do Laboratório de Bacteriologia Clínica da Universidade Federal do Paraná.

4.2 ENSAIOS MOLECULARES

4.2.1 Condições de cultivo

As estirpes de *Aeromonas* foram cultivadas em ágar triptona de soja (TSA) a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 18-24 horas.

4.2.2 Extração de DNA

Uma colônia foi inoculada em caldo nutriente e incubada a 36°C *overnight* sob agitação de 100 rpm. Aproximadamente 1,5 mL do meio de cultura foi centrifugado a 11.000 rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi utilizado para a extração do DNA pelo método do

fenol-clorofórmio (AUSUBEL et al., 1992). O DNA foi mantido sob refrigeração (2-4 °C) até o momento da análise.

4.2.3 Determinação da presença dos genes de virulência

A determinação dos genes de virulência foi feita através da reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando iniciadores específicos para cada gene. As seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados estão indicadas na tabela 2.

TABELA 2 – SEQÜÊNCIAS DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES (CONTINUA)

Iniciador	Seqüência 5'→3'	Tamanho amplicon (pb)	Referência
<i>vasH</i>	F - CCGGTGAACCCATCAAGCGCGTCCACT R - TGGTGGCCAGCAGCAGAGGCAATA	1627	SUAREZ et al., 2008
<i>Alt</i>	F – AAAGCGTCTGACAGCGAAGT R - AGCGCATAGGCGTTCTCYT	320	AGUILERA-ARREOLA et al., 2005
<i>ascV</i>	F - ATG GAC GGC GCC ATG AAG TT R - TAT TCG CCT TCA CCC ATC CC	710	CHACÓN et al., 2004
<i>ascF-G</i>	F - ATG AGG TCA TCT GCT CGC GC R - GGA GCA CAA CCA TGG CTG AT	620	CHACON et al., 2004
<i>act</i>	F - GAGAAGGTGACCACCAAGAACA R - AACTGACATCGGCCTTGAAGTC	232	SEN E RODGERS, 2004
<i>stx1</i>	F - ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC R – AGAACGCCCACTGAGATCATC	180	PATON e PATON, 1998
<i>stx2</i>	F - GGCACTGTCTGAAACTGCTCC R - TCGCCAGTTATCTGACATTCTG	255	PATON e PATON, 1998
<i>Ast</i>	F - TCTCCATGCTTCCCTTCCACT R - GTGTAGGGATTGAAGAAGCCG	331	SEN e RODGERS ., 2004
<i>Lipase (lip)-</i>	F - ATCTTCTCCGACTGGTTCGG R - CCGTGCCAGGACTGGGTCTT	382	SEN e RODGERS, 2004

TABELA 2 – SEQUÊNCIAS DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES (CONCLUSÃO)

<i>Elastase (ela)-</i>	F ACACGGTCAAGGAGATCAAC R CGCTGGTGTGGCCAGCAGG	513	SEN e RODGERS et al., 2004
<i>aer</i>	F CCGGAAGATGAACCAGAATAAGAG R CTTGTCGCCACATACCTCCTGGCCC	451	CASTILHO et al., 2009
<i>aerA</i>	AerA A1 GCCTGAGCGAGAAGGT AerA A2 CAGTCCCACCCACTTC	418	CASTILHO et al., 2009
<i>hlyA</i>	GGCCGGTGGCCCGAAGATACGGG GGCGGCGCCGGACGAGACGGG	595	CASTILHO et al., 2009
<i>16S rDNA</i>	F:AGAGTTTGATCATGGCTCAG R:GGTTACCTTGTTACGACTT	1502	BORREL et al., 1997

Os iniciadores foram sintetizados pela Sinapse, SP (Bioneer)

4.2.4 Condições de ensaio da PCR

As reações de PCR foram realizadas em volume final de 25 µL contendo aproximadamente 20ng de DNA, tampão da Taq 1X, MgCl₂ 1,5mM, dNTP 0,2 mM, oligonucleotídeos iniciadores específicos para cada um dos genes na concentração de 10 pmol, Taq DNA Polimerase 1U.

TABELA 3 – COMPONENTES DA PCR

COMPONENTES	QUANTIDADE (µL)
Tampão Taq DNA polimerase (10x)	2,5
MgCl ₂ 1,5Mm (25mM)	1,5
dNTP (Invitrogen) 0,2mM (5mM)	1,0
Iniciador F (10 pmol/µL)	1,0
Iniciador R (10 pmol/µL)	1,0
Taq DNA polimerase (Fermentas) 1U (5U/ µL)	0,3
DNA	1,5
Água	qsp 25 µL
TOTAL:	25,0

Para a reação da PCR foi utilizado o termociclador Veriti (Applied Biosystems). As condições utilizadas para a amplificação dos genes *lipase*, *elastase*, *act*, *ast*, *ascV* e *16S rDNA* estão descritas abaixo:

NÚMERO DE CICLOS	TEMPERATURA (°C)	TEMPO	
1	95	2'	Desnaturação
	95	1'	Desnaturação
30	55	30''	Anelamento
	72	1,30'	Extensão
1	72	5'	Extensão

Para os genes *vasH*, *alt*, *aerA* e *hlyA* as condições permanecem as mesmas porém com mudança na temperatura de anelamento, respectivamente de 65°C, 60°C, 53°C e 65°C.

Para o gene *aer* utilizou-se uma rampa, com variação da temperatura de anelamento entre 65 e 56,3° e tempo de extensão 1 min. Para o gene *ascFG* foram utilizadas as mesmas condições, exceto pelas temperaturas do programa de rampa, 62 a 53,3°C.

Para os genes *stx₁* e *stx₂* o programa utilizado para a amplificação foi o seguinte:

NÚMERO DE CICLOS	TEMPERATURA (°C)	TEMPO	
1	94	4'	Desnaturação
	94	1'	Desnaturação
30	55	30''	Anelamento
	72	30''	Extensão
1	72	10'	Extensão

Estirpes utilizadas como controle. *A. hydrophila* ATCC 7966 foi utilizada como controle positivo para os genes *lipase*, *elastase*, *act*, *ast*, *alt*, *vasH*, *hlyA*, *aerA*, *aer*. Para os genes *ascV* e *ascFG* foi utilizado a estirpe de *A. veronii* sobria 49H. Para os genes *stx₁* e *stx₂* foi utilizada uma estirpe de STEC 0157.

Em todas as reações foi utilizado um controle, também chamado de branco, contendo todos os componentes da reação exceto o DNA.

Paralelamente às análises para a detecção dos genes de virulência foi realizada, para todas as estirpes, a amplificação do gene 16S rDNA para confirmar a ausência de inibidores na amostra de DNA.

4.2.5 Visualização dos produtos da PCR

A visualização dos produtos da PCR foi realizada através da eletroforese em gel de agarose. Os géis foram preparados em tampão TBE 1X (SAMBROOK, FRITSCH e MANIATIS, 1989) que também foi utilizado como tampão para a corrida eletroforética realizada a 35V durante 3 horas. Após a corrida eletroforética, o gel foi corado em solução de brometo de etídio 1µg/µL durante 10 minutos, visualizado em transluminador ultra-violeta no comprimento de onda 302nm e fotodocumentado utilizando o sistema UVP BioImaging Systems.

4.2.6 Sequenciamento de DNA

Os produtos de PCR (6 µl) foram tratados com as enzimas Exonuclease I (USB, 3,3 U) e SAP (Fosfatase alcalina de camarão - USB, 0,66 U) com o objetivo de eliminar os resíduos dos iniciadores e de dNTP. Os microtubos do tipo eppendorf contendo a mistura foram incubados a 37°C durante 60 minutos, e então a 80°C por 20 minutos. O produto foi utilizado na reação de seqüenciamento, baseada no método de SANGER modificado utilizando dideoxinucleotídeos fluorescentes. As reações foram realizadas em volume final de 10µL contendo 10pmol de oligonucleotídeo iniciador, aproximadamente 200 ng do produto de PCR purificado e 4µL do reagente *DYEnamic ET Sequence Premix Terminator (DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit, Amersham Biosciences)*. Foi utilizado o seguinte programa: 30 ciclos de 94°C por 30s, 56°C por 20s, 60°C por 2min. O produto

da reação de seqüenciamento foi transferido para um microtubo de 500 µL ao qual foram adicionados 2µL de acetato de amônio 7,5M e 55 µL de etanol absoluto. A mistura foi homogeneizada em agitador tipo vórtex, mantida a temperatura ambiente por 20 minutos e então centrifugada por 25min a 14000 rpm em microcentrífuga Eppendorf modelo 5410. O sobrenadante foi removido e o precipitado lavado duas vezes com 250 µL de etanol 70% e seco em estufa a 37°C. O DNA foi dissolvido em 4 µL de *Formamide Loading Dye* (Applied Biosystems) e submetido à eletroforese no Seqüenciador automático de DNA modelo ABI Prism 377 do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR. As seqüências obtidas foram analisadas com os programas BioEdit Sequence Alignment Editor (HALL, 1999), BLASTN (ALTSCHUL *et al.*, 1997) e CLUSTAL W (THOMPSON, HIGGINS e GIBSON, 1994) (<http://www.ebi.ac.uk/tools/clustalw/>).

4.3 ENSAIOS BIOLÓGICOS

4.3.1 Hemólise

A habilidade de diferentes estirpes de *Aeromonas* em provocar a lise de eritrócitos (hemólise) foi determinada através do método de SCHEFFER e colaboradores (1988) com algumas modificações. Estirpes de *Aeromonas* foram inoculadas em caldo nutriente e incubadas a 37°C. Após 4, 6, 18 e 24 horas, porções das culturas foram coletadas (0,2 mL) e incubadas, por duas horas a 37°C, com 0,2 mL de uma suspensão contendo eritrócitos humanos frescos do tipo “O” Rh+ (10^8 /mL) em tampão de hemólise (20 mM CaCl_2 , 10 mM Tris, 140 mM NaCl, pH 7,4). Este ensaio foi executado para determinar o melhor tempo de cultivo bacteriano para a produção de toxinas capazes de induzir hemólise. Para tal algumas estirpes foram escolhidas aleatoriamente e a hemólise, quando gerada, foi mensurada qualitativamente em cruzes.

Para padronizar o melhor tempo de incubação dos eritrócitos com as culturas bacterianas para a observação da hemólise, algumas estirpes foram

escolhidas aleatoriamente e culturas de 18 horas foram incubadas com a suspensão de eritrócitos por diferentes tempos (10, 30, 60 e 120 minutos). A hemólise, quando gerada, foi mensurada qualitativamente em cruces

Após a padronização do melhor tempo de cultura bacteriana e melhor período de contato com os eritrócitos, todas as estirpes bacterianas foram submetidas ao ensaio de hemólise como descrito no parágrafo anterior. Entretanto, a hemólise gerada foi mensurada quantitativamente após leitura do sobrenadante das incubações em espectrofômetro (540 nm). Os níveis de hemólise foram representados em porcentagem em relação ao controle positivo (hemólise de 100% feito com tampão de hemólise, caldo nutriente e triton X-10 0,1%). Além desse, outro controle positivo utilizando cultura com estirpe padrão, *A. hydrophila* ATCC 7966, com habilidade conhecida de provocar hemólise, também foi utilizada. Como controles negativos foram utilizadas suspensões eritrocitárias incubadas somente com caldo nutriente estéril, e também com a estirpe padrão, *A. caviae* ATCC 14486, sem habilidade de induzir hemólise. Nos ensaios de hemólise foram utilizadas as culturas totais e o seus respectivos sobrenadantes após centrifugação a 7.500 rpm por 5 minutos.

4.3.2 Citotoxicidade

Para avaliar a atividade citotóxica das estirpes de *Aeromonas* foi utilizado método colorimétrico com 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)2,5-Difenil Brometo de Tetrazólio) - MTT. O princípio deste método descrito por MOSMAN (1983) consiste em medir indiretamente a viabilidade celular pela atividade enzimática mitocondrial das células vivas. Quando as células estão viáveis as desidrogenases mitocondriais são capazes de agir sobre substratos, como o MTT, levando a quebra dessa molécula e a sua redução, formando, assim, cristais púrpuras de formazan. Portanto, quanto maior a viabilidade celular em uma determinada amostra, mais cristais de formazan são formados. Os cristais de formazan são solubilizados com isopropanol em meio ácido e a cor formada

após a solubilização é quantificada através de espectofotometria, utilizando-se filtro de 550 nm.

Para avaliar a ação citotóxica das estirpes de *Aeromonas*, foram plaqueadas 15.000 células epiteliais de adenocarcinoma colorretal, HRT-18, por poço, em microplacas de 96 poços. Após o plaqueamento, as células foram tratadas com 70 µL do sobrenadante (filtrado com membrana de 0,22 µm) das culturas bacterianas cultivadas por 18 horas em caldo nutriente, a partir de um inóculo de 100µL de uma suspensão bacteriana padronizada na escala 0,5 de MacFarland. A esses 70 µL foram adicionados 70 µL do meio de cultivo celular – RPMI – com soro bovino fetal e incubadas por 24 hr em estufa a 37°C contendo 5% CO₂. Ao fim da incubação foram adicionados aos poços 45 µL de MTT na concentração de 0,5 mg/mL. A placa foi novamente incubada a 37°C e após 2 horas foram adicionados 100 µL de isopropanol ácido (HCl 0,01 M). Como controle de células viáveis foram utilizados poços contendo as células incubadas com 70 µL de caldo nutriente e como controle de células não viáveis foram utilizados poços contendo células incubadas com 0,1% de triton X-100. Também foram utilizados como controles as estirpes *A.hydrophila* ATCC 7966, com citotoxicidade conhecida e *A.caviae* ATCC 14486, pouco citotóxica. A citotoxicidade foi expressa em porcentagem de células viáveis em relação ao controle de células viáveis.

Além do ensaio com MTT as células foram avaliadas quanto a sua morfologia ao microscópio ótico, 3 e 24 horas após a adição dos sobrenadantes das culturas bacterianas.

4.3.3 Tratamento estatístico

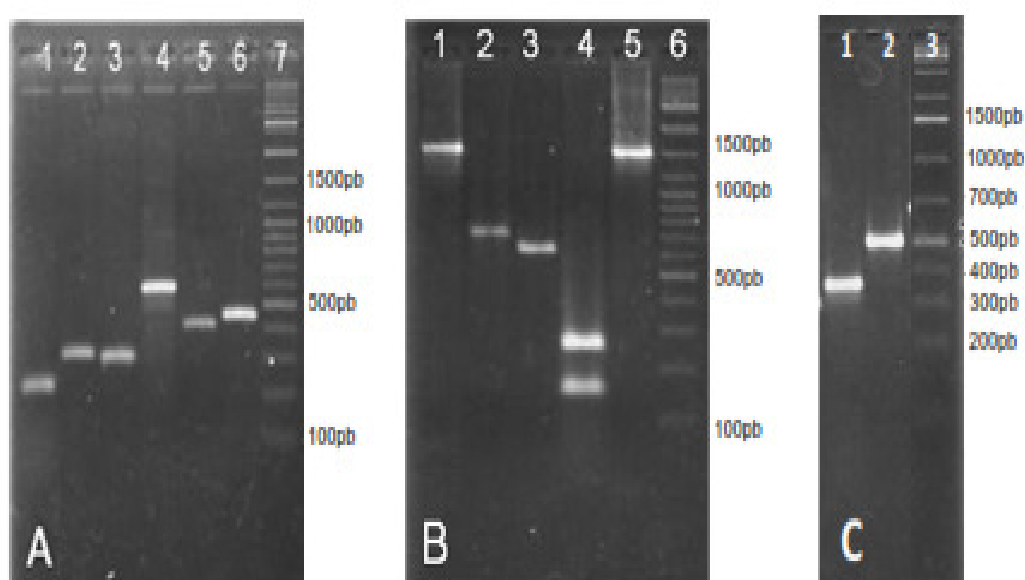
Para a análise estatística dos dados obtidos de hemólise e citotoxicidade foi utilizado análise de variância (ANOVA de uma via) e pós teste de Tukey. Foi considerado estatisticamente significativo $p \leq 0,05$. Para tais análises foi utilizado o software Graphpad versão 5.0.

5 RESULTADOS

5.1 ENSAIOS MOLECULARES

A figura 1 mostra os resultados obtidos nas reações de PCR realizadas com DNA extraído de *A. hydrophila* ATCC 7966, *A. veronii* sobria 49H e STEC O157:H7, utilizadas como controles positivos para os genes em estudo.

FIGURA 1 – PRODUTOS DE PCR PARA GENES DE VIRULÊNCIA



Gel de agarose 2%, pb - pares de bases. **Fig 1A** – 1 a 6 produtos de amplificação de fragmentos dos genes de virulência *act*, *ast*, *alt*, *hlyA*, e *aerA*, respectivamente. 7. Marcador de massa molecular 1Kb DNA Ladder (Fermentas). **Fig. 1B**. 1 a 5 produtos de amplificação de fragmentos dos genes *vash*, *ascV*, *ascF-G*, e *stx*₁ e *stx*₂. 5. Produto de amplificação do gene *16S rDNA*. 6. Marcador de massa molecular 1Kb DNA Ladder (Fermentas). **Fig. 1C**. 1 e 2 produtos de amplificação de fragmentos dos genes *lip* e *ela*. 3 Marcador de massa molecular 1Kb DNA Ladder (Fermentas).

Os resultados das reações de PCR mostram que os fragmentos amplificados apresentam os tamanhos esperados para cada gene alvo, como citado na Tabela 2.

5.1.1 Perfil de virulência das estirpes de *Aeromonas* spp.

As 100 estirpes de *Aeromonas* foram analisadas quanto a presença de 13 genes associados com virulência, incluindo alguns que codificam o T3SS (*ascFG*, *ascV*), T6SS (*vasH*), as enterotoxinas citotônicas termo-lábil e termo estável (*alt* e *ast*, respectivamente), a enterotoxina citotóxica (*act*), lipase e elastase (*lip* e *ela*), hemolisinas (*aer*, *aerA*, *hlyA*) e toxina Shiga tipo Stx1 e Stx2 (*stx₁* e *stx₂*).

Os resultados obtidos estão indicados na tabela 4.

TABELA 4 – GENES DE VIRULÊNCIA NAS ESTIRPES DE *AEROMONAS*
(CONTINUA)

Estirpe	Genes de Virulência												
	<i>ascV</i>	<i>ascFG</i>	<i>vash</i>	<i>alt</i>	<i>ast</i>	<i>act</i>	<i>lip</i>	<i>ela</i>	<i>Era</i>	<i>aerA</i>	<i>hlyA</i>	<i>stx₁</i>	<i>stx₂</i>
7966	N	N	P	P	P	P	P	P	P	P	P	N	N
14486	N	N	P	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N
1	N	N	P	N	P	P	P	P	N	P	P	N	N
2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	N
4	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N
6	N	N	N	N	P	N	P	P	N	N	N	N	N
7	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
8	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N
9	N	N	P	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N
10	N	N	N	N	P	N	P	P	N	N	P	N	N
11	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N
14	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N
18	N	N	N	N	N	P	N	P	N	P	N	N	N
19	N	N	N	P	N	N	P	P	N	N	P	N	N
20	P	P	N	N	N	P	N	N	N	P	N	N	N
22	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
23	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N
25	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N
26	P	P	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N
29	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N
31	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N
32	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N
35	N	N	N	N	N	P	N	N	N	P	N	N	N
36	P	P	N	N	N	P	N	N	N	P	N	N	N
37	P	P	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N
38	N	N	N	N	N	P	N	P	N	P	N	N	N
39	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N
40	N	N	N	N	N	P	N	P	N	P	N	N	N
42	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N
43	N	N	N	N	N	P	N	P	N	P	N	N	N
44	N	P	N	N	P	N	P	P	N	N	P	N	N
45	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N
46	N	N	N	N	N	P	P	P	N	N	N	N	N
47	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
49	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
50	N	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N
51	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N
53	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N
55	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N
56	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N

TABELA 4 – GENES DE VIRULÊNCIA NAS ESTIRPES DE *AEROMONAS*
(CONTINUA)

Estirpe	Genes de Virulência												
	<i>ascV</i>	<i>ascFG</i>	<i>vasH</i>	<i>alt</i>	<i>ast</i>	<i>act</i>	<i>lip</i>	<i>ela</i>	<i>Era</i>	<i>aerA</i>	<i>hlyA</i>	<i>stx₁</i>	<i>stx₂</i>
59	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N
60	N	P	N	N	P	N	P	P	N	N	P	N	N
61	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N
62	N	N	N	N	P	N	P	P	P	N	N	N	N
63	N	N	N	N	P	N	P	P	N	N	P	N	N
64	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N
66	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N
67	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N
68	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N
69	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N
70	N	N	N	N	N	P	P	P	N	P	N	N	N
71	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N
72	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N
73	P	P	N	N	N	P	N	N	N	P	N	N	N
74	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N
210M	N	N	N	N	N	P	N	P	N	P	N	N	N
61M	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N
359M	N	N	P	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N
329M	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N
297M	N	P	P	P	P	N	P	P	N	N	P	N	N
207M	N	N	P	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N
423M	N	N	P	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N
594M	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N
85bM	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N
346M	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N
92M	N	N	P	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N
55M	N	N	P	P	P	P	P	P	N	P	P	N	N
42M	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N
507M	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N
235M	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N
100M	N	N	P	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N
547M	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N
312M	N	P	N	N	N	P	N	P	N	P	N	N	N
LCR 1999	N	N	N	N	N	N	P	N	N	P	N	N	N
49H	P	P	N	N	N	P	N	N	N	P	N	N	N
30	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N
96C	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N
2LM	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N
97C	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N
248C	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N

TABELA 4 – GENES DE VIRULÊNCIA NAS ESTIRPES DE *AEROMONAS*
(CONCLUSÃO)

Estirpe	Genes de Virulência												
	<i>ascV</i>	<i>ascFG</i>	<i>VasH</i>	<i>alt</i>	<i>ast</i>	<i>act</i>	<i>lip</i>	<i>ela</i>	<i>Era</i>	<i>aerA</i>	<i>hlyA</i>	<i>stx₁</i>	<i>stx₂</i>
Karol	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N
242C	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N
F1	N	P	P	P	P	N	P	P	N	N	P	N	N
F2	N	P	P	P	P	N	P	P	N	N	P	N	N
34LM	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N
252C	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N
27LM	N	N	P	P	N	N	P	P	N	P	P	N	N
92C	N	N	P	P	N	N	P	P	N	P	P	N	N
93C	N	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	N	N
5LM	N	P	N	P	P	N	P	P	N	N	P	N	N
16LM	N	N	P	P	P	N	P	P	N	N	P	N	N
8LM	N	N	P	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N
10LM	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N
Loc CN1	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N
Loc CN15	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N
Loc 121	N	N	P	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N
Loc 81	N	P	P	P	P	P	P	P	P	P	N	N	N
68LM	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
69LM	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N
F3	N	P	P	P	P	N	P	P	N	N	P	N	N
162c	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N
184c	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N

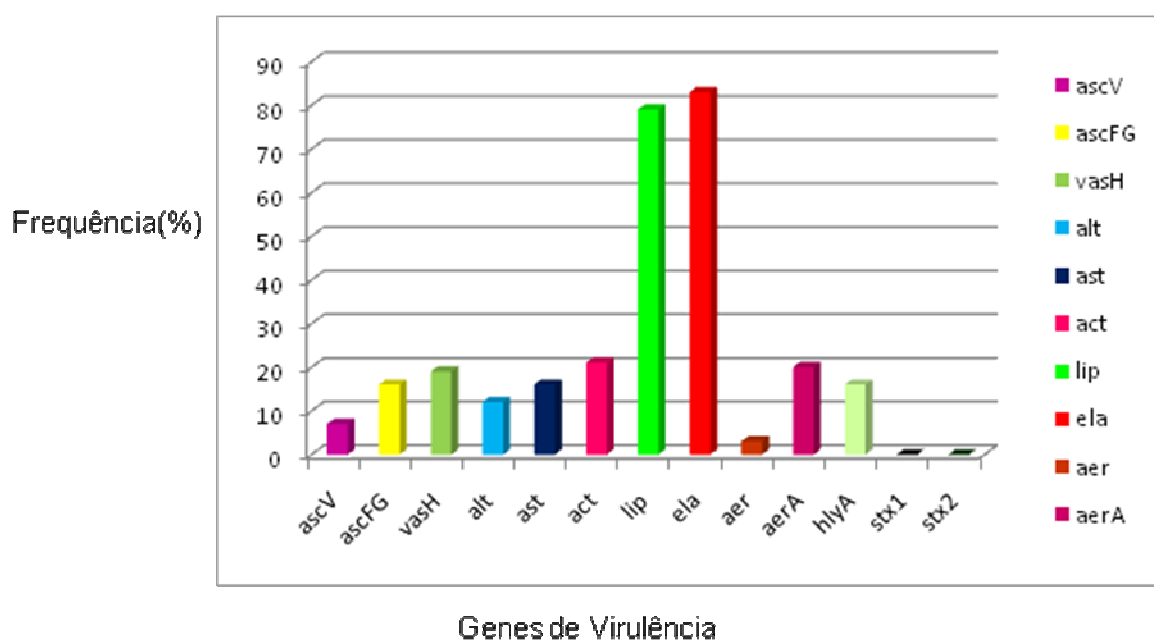
NOTA: P: Positivo; N: Negativo.

Entre as 100 *Aeromonas* analisadas, 4 (4%) não apresentaram nenhum dos genes de virulência estudados; 5 (5%) apresentaram somente um, e a maioria estirpes apresentou entre 2 a 4 genes de virulência.

Não foi observada amplificação para os genes *stx*₁ e *stx*₂ em nenhuma das bactérias analisadas, indicando que essas estirpes de *Aeromonas* não produzem toxinas do tipo Shiga.

A figura 2 mostra a frequência dos genes de virulência encontrados nas 100 estirpes de *Aeromonas*.

FIGURA 2 - FREQUÊNCIA DOS GENES DE VIRULÊNCIA NAS ESTIRPES DE AEROMONAS



A figura 2 indica que a distribuição dos genes de virulência é heterogênea, e que com exceção daqueles que codificam as proteases extracelulares, *ela* e *lip* presentes respectivamente em 83% e 79% das estirpes, e *stx*₁ e *stx*₂ que não foram detectados nas bactérias analisadas, a frequência dos demais varia na faixa entre 3 a 21%.

A Tabela 5 mostra a distribuição dos genes de virulência de acordo com as espécies de *Aeromonas*.

TABELA 5 – DISTRIBUIÇÃO DOS GENES DE VIRULÊNCIA NAS ESPÉCIES DE *AEROMONAS*.

Espécie	Número de estirpes	Número de isolados positivos, e frequência (%)												
		<i>ascV</i>	<i>ascFG</i>	<i>vasH</i>	<i>alt</i>	<i>Act</i>	<i>Lip</i>	<i>Ela</i>	<i>aer</i>	<i>aerA</i>	<i>hlyA</i>	<i>stx₁</i>	<i>stx₂</i>	<i>ast</i>
<i>A.hydrophila</i>	13	0(0)	7(53,8)	8(61,5)	8(61,5)	4(30,8)	12(92,3)	12(92,3)	2(15,3)	5(38,5)	11(84,6)	0(0)	0(0)	11(84,6)
<i>A.trota</i>	3	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(33,3)	0(0)	0(0)	2(66,7)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
<i>A.caviae</i>	63	1(1,6)	1(1,6)	7(11,1)	1(1,6)	4(6,3)	58(92)	59(93,6)	1(1,6)	3(4,8)	2(3,1)	0(0)	0(0)	3(4,8)
<i>A.veronii</i> sobria	13	5(38,4)	6(46,1)	0(0)	0(0)	13(100)	1(7,7)	5(38,4)	0(0)	9(69,2)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
<i>Aeromonas</i> <i>spp</i>	8	1(12,5)	1(12,5)	4(50)	3(37,5)	0(0)	7(87,5)	7(87,5)	0(0)	1(12,5)	2(25)	0(0)	0(0)	1(12,5)

Estes dados sugerem que a distribuição dos genes de virulência é heterogênea entre as espécies de *Aeromonas*. *A. hydrophila* é a espécie que apresentou o maior número de genes de virulência, com estirpes positivas para 10 dos 13 genes analisados. Comportamento oposto foi observado para *A. trota*, espécie para a qual não houve amplificação de 11 dos 13 genes analisados.

TABELA 6 - GENÓTIPOS ENCONTRADOS ENTRE AS ESTIRPES DE AEROMONAS (CONTINUA)

Espécie/estirpe	Genótipo
<i>A. hydrophila</i>	
	1 vasH/act/lip/ela/aerA/hlyA/ast
44, 60	ascFG/lip/ela/hlyA/ast
49	Ausência dos genes analisados
63	lip/ela/hlyA/ast
55M	vasH/alt/act/lip/ela/aerA/hlyA/ast
F2, F3, 297M	vasH/alt/ascFG/lip/ela/hlyA/ast
LOC 81	vasH/alt/ascFG/act/lip/ela/aer/aerA/ast
5LM	alt/ascFG/lip/ela/hlyA/ast
92C	vasH/alt/lip/ela/aerA/hlyA
93C	vasH/alt/ascFG/act/lip/ela/aer/aerA/hlyA/ast
<i>A. trota</i>	
	2 AerA
	7 Ausência dos genes analisados
	LCR lip/aerA
<i>A. caviae</i>	
4, 8, 11, 14, 23, 25, 29, 30, 31, 32, 42, 45, 53, 55, 56, 59, 61, 64, 66, 67, 68, 69, 71, 72, 74, 96C, 97C, 184C, 242C, 248C, 252C, LOC CN1, 2LM, 10LM, 34LM, 69LM, 42M, 235M, 507M, 547M, 61M, 329M, 85AM, 594M, 346M	lip/ela
	6 lip/ela/ast
9, 8LM, 92M, 100M, 207M, 359M, 423M,	vasH/lip/ela
	10 lip/ela/hlyA/ast
18, 43	act/ela/aerA
19	alt/lip/ela/hlyA
22, 47	Ausência dos genes analisados
46	act/lip/ela
50	Lip
62	lip/ela/aer/ast
73	ascV/ascFG/ act/ aerA

TABELA 6 - GENÓTIPOS ENCONTRADOS ENTRE AS ESTIRPES DE *AEROMONAS* (CONCLUSÃO)

Espécie/estirpe	Genótipo
<i>A. veronii</i> sóbria	
20, 36, 49H	ascV/ascFG/act/aerA
26, 37	ascV/ascFG/act
35	act/aerA
38, 40, 210M	act/ela/aerA
39, 51	Act
70	act/lip/ela/aerA
312M	ascFG/act/ela/aerA
<i>Aeromonas</i> spp	
16LM	vasH/alt/lip/ela/hlyA/ast
162C, Karol, LOC CN15	lip/ela
F1	vasH/alt/ascFG/lip/ela
27LM	vasH/alt/lip/ela/aerA/hlyA
LOC 121	vasH/lip/ela
68LM	AscV

A Tabela 7 compila os resultados fenotípicos e genotípicos.

TABELA 7 – RESULTADOS FENOTÍPICOS E GENOTÍPICOS ENCONTRADOS NAS ESTIRPES DE AEROMONAS (CONTINUA)

Estirpe	Ensaio Genotípicos											Ensaio Fenotípicos			
	Genes de Virulência											Hemólise	Citotoxicidade		
	<i>ascV</i>	<i>ascFG</i>	<i>vash</i>	<i>alt</i>	<i>ast</i>	<i>act</i>	<i>lip</i>	<i>ela</i>	<i>aer</i>	<i>aerA</i>	<i>hlyA</i>			<i>stx1</i>	<i>stx2</i>
O157	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	P	ND	ND
7966	N	N	P	P	P	P	P	P	P	P	P	N	N	P	P
14486	N	N	P	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	N	N
1	N	N	P	N	P	P	P	P	N	P	P	N	N	P	P
2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N
4	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	P	N
6	N	N	N	N	P	N	P	P	N	N	N	N	N	N	N
7	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	N
8	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	N	N
9	N	N	P	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	P	N
10	N	N	N	N	P	N	P	P	N	N	P	N	N	P	N
11	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	P	N
14	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	P	N
18	N	N	N	N	N	P	N	P	N	P	N	N	N	P	P
19	N	N	N	P	N	N	P	P	N	N	P	N	N	P	P
20	P	P	N	N	N	P	N	N	N	P	N	N	N	P	P
22	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	N
23	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	P	N
25	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	P	N
26	P	P	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	P	P
29	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	P	P
31	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	N	N
32	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	P	N
35	N	N	N	N	N	P	N	N	N	P	N	N	N	P	P
36	P	P	N	N	N	P	N	N	N	P	N	N	N	P	P
37	P	P	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	P	P
38	N	N	N	N	N	P	N	P	N	P	N	N	N	P	P
39	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	P	P
40	N	N	N	N	N	P	N	P	N	P	N	N	N	P	P
42	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	P	P
43	N	N	N	N	N	P	N	P	N	P	N	N	N	N	N
44	N	P	N	N	P	N	P	P	N	N	P	N	N	P	P
45	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	P	N
46	N	N	N	N	N	P	P	P	N	N	N	N	N	P	N
47	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	N
49	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	N
50	N	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	P	N
51	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	P	N
53	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	P	N

TABELA 7 – RESULTADOS FENOTÍPICOS E GENOTÍPICOS ENCONTRADOS NAS ESTIRPES DE *AEROMONAS* (CONTINUA)

Estirpe	Ensaio Genotípicos												Ensaio Fenotípicos		
	Genes de Virulência												Hemólise	Citotoxicidade	
	<i>ascV</i>	<i>ascFG</i>	<i>vash</i>	<i>alt</i>	<i>ast</i>	<i>act</i>	<i>lip</i>	<i>ela</i>	<i>aer</i>	<i>aerA</i>	<i>hlyA</i>	<i>stx1</i>			<i>stx2</i>
55	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	P	N
56	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	P	N
59	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	N	N
60	N	P	N	N	P	N	P	P	N	N	P	N	N	P	N
61	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	P	N
62	N	N	N	N	P	N	P	P	P	N	N	N	N	N	N
63	N	N	N	N	P	N	P	P	N	N	P	N	N	P	P
64	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	N	N
66	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	P	N
67	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	P	P
68	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	N	P
69	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	N	P
70	N	N	N	N	N	P	P	P	N	P	N	N	N	P	P
71	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	P	P
72	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	P	P
73	P	P	N	N	N	P	N	N	N	P	N	N	N	P	P
74	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	P	P
210M	N	N	N	N	N	P	N	P	N	P	N	N	N	P	P
61M	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	P	N
359M	N	N	P	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	P	N
329M	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	P	P
297M	N	P	P	P	P	N	P	P	N	N	P	N	N	P	P
207M	N	N	P	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	N	N
423M	N	N	P	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	P	N
594M	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	P	N
85Bm	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	P	P
346M	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	P	N
92M	N	N	P	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	P	P
55M	N	N	P	P	P	P	P	P	N	P	P	N	N	P	P
42M	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	P	ND
507M	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	P	N
235M	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	P	P
100M	N	N	P	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	P	N
547M	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	P	N
312M	N	P	N	N	N	P	N	P	N	P	N	N	N	P	P
LCR 1999	N	N	N	N	N	N	P	N	N	P	N	N	N	P	P
49H	P	P	N	N	N	P	N	N	N	P	N	N	N	P	N
30	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	N	P
96C	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	P	P
2LM	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	P	N
97C	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	P	P
248C	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	N	N
Karol	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	P	N

TABELA 7 – RESULTADOS FENOTÍPICOS E GENOTÍPICOS ENCONTRADOS NAS ESTIRPES DE *AEROMONAS* (CONCLUSÃO)

Estirpe	Ensaio Genotípicos												Ensaio Fenotípicos		
	Genes de Virulência												Hemólise	Citotoxicidade	
	<i>ascV</i>	<i>ascFG</i>	<i>vasH</i>	<i>alt</i>	<i>ast</i>	<i>act</i>	<i>lip</i>	<i>ela</i>	<i>aer</i>	<i>aerA</i>	<i>hlyA</i>	<i>stx1</i>			<i>stx2</i>
242C	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	P	N
F1	N	P	P	P	P	N	P	P	N	N	P	N	N	P	P
F2	N	P	P	P	P	N	P	P	N	N	P	N	N	P	P
34LM	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	P	N
252C	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	P	N
27LM	N	N	P	P	N	N	P	P	N	P	P	N	N	P	P
92C	N	N	P	P	N	N	P	P	N	P	P	N	N	P	P
93C	N	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	N	N	P	P
5LM	N	P	N	P	P	N	P	P	N	N	P	N	N	P	P
16LM	N	N	P	P	P	N	P	P	N	N	P	N	N	P	P
8LM	N	N	P	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	P	N
10LM	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	P	N
Loc CN1	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	N	N
Loc CN15	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	P	N
Loc 121	N	N	P	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	P	N
Loc 81	N	P	P	P	P	P	P	P	P	P	N	N	N	P	P
68LM	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
69LM	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	P	N
F3	N	P	P	P	P	N	P	P	N	N	P	N	N	ND	ND
162c	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	ND	ND
184c	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	ND	ND

Nota: N:negativo; P:Positivo; ND: Não Determinado

Os dados mostrados na Tabela 6 mostram o predomínio de diferentes genótipos nas espécies de *Aeromonas*. Em *A. hydrophila* 10 genótipos foram identificados, e a maioria das estirpes apresentou combinações variando de 6 a 10 genes de virulência. Em contraste, as 3 estirpes de *A. trota* não apresentaram nenhum, ou apenas 1 ou 2 desses genes. Para *A. caviae* foram identificados 11 genótipos, mas a maioria das estirpes (71%) apresentou apenas a combinação dos genes *ela* e *lip*. O número máximo de genes identificados nestas bactérias foi 4. Sete genótipos distintos foram observados para *A. sobria*, sendo que a maioria (77%) das estirpes apresentou combinações de 3 ou 4 genes de virulência. Para *Aeromonas* spp 6 genótipos foram encontrados, 3 das 8 estirpes apresentaram 2 genes; e 2 estirpes 6 genes de virulência.

5.1.2 Sequenciamento dos amplicons

A estirpe 49H foi a primeira na qual foi detectada a presença de genes marcadores do T3SS, e passou a ser utilizada como controle para os genes *ascV* e *ascFG* após a confirmação da identidade dos mesmos através de seqüenciamento de DNA.

Como indicado na Tabela 6, em algumas estirpes de *A. hydrophila*, de *A. veronii* sobria e *Aeromonas* spp. houve amplificação para o gene *ascFG*, mas não para o *ascV*, sendo que ambos fazem parte do T3SS. Por esta razão os fragmentos para o gene *ascFG* foram seqüenciados para verificar sua identidade.

Os resultados do seqüenciamento dos amplicons, após comparação com as sequências depositadas no GenBank e alinhamento utilizando o programa ClustalW, estão indicados nas Tabelas 8 e 9 e nas Figuras 3 a 5.

TABELA 8 - SEQUÊNCIAS DO GENBANK QUE PRODUZIRAM ALINHAMENTOS SIGNIFICATIVOS COM OS AMPLICONS DE *ascFG*

Estirpe	Homologia	Score	Valor de e	Identidade(%)	Cobertura
44	<i>Aeromonas hydrophila</i> strain AH-1 type III secretion system gene locus, complete sequence.	331	1e-87	95	100
60	<i>Aeromonas hydrophila</i> strain AH-1 type III secretion system gene locus, complete sequence.	346	2e-91	96	100
F1	<i>Aeromonas hydrophila</i> strain AH-1 type III secretion system gene locus, complete sequence.	246	3e-62	97	100
297M	<i>Aeromonas hydrophila</i> strain AH-1 type III secretion system gene locus, complete sequence.	239	4e-60	97	100
5LM	<i>Aeromonas hydrophila</i> strain AH-1 type III secretion system gene locus, complete sequence.	199	3e-48	91	97
49H	<i>Aeromonas hydrophila</i> strain AH-1 type III secretion system gene locus, complete sequence.	255	5e-65	99	100
F2	<i>Aeromonas hydrophila</i> strain AH-1 type III secretion system gene locus, complete sequence.	250	2e-63	98	100
93c	<i>Aeromonas hydrophila</i> strain AH-1 type III secretion system gene locus, complete sequence.	244	9e-62	97	100
Loc 81	<i>Aeromonas hydrophila</i> strain AH-1 type III secretion system gene locus, complete sequence.	349	5e-93	97	100

FIGURA 3 – ALINHAMENTO DAS SEQUENCIAS DOS AMPLICONS DE *Aeromonas* 297M, F2, F1, 93c, 5LM, 49H COM O GENE *ascFG* DE *Aeromonas hydrophila* ESTIRPE AH-1

```

297M      GCCTTGCCAAGCGCAATACCAGCTCAGTCGTGTCATGCCGAGCCGCCATTACACAGGG 58
F2        GCCTTGCCAAGCGCAATACCAGCTCA-TCGTGTCATGCCGAGCCGCCATTACACAGGG 57
AY394563.2 GCCTTGCCAACCGCAATACCAGCTCA-TCGTGTCATGCCGAGCCGCCATTACACAGGG 57
F1        GCCTTGCCAACCGCAATACCAGCTCA-TCGTGTCATGCCGAGCCGCCATTACACAGGG 57
93c       GCCTTGCCAACCGCAATACCAGCTCAGTCGTGTCATGCCGAGCCGCCATTACACAGGG 58
5LM       CTCTTGCCAACCGCAATACCAGCTCAGTCGTGTCATGCCGAGCCGCCATTACACAGGG 60
49H       GTCGCAGCAACCGTGCAGCCAGCGCC-TCCTGCTGACCAACCGCCACTCGCACAGGG 57
          *   ***   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
          *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

297M      CGAACCAGGGTTCAACATCCGCAAAGTGGTGCGAGGTTTCCAGCAGCAGTGCGCTCTGAT 118
F2        CGAACCAGGGTTCAACATCCGCAAGTGGTGCGAGGTTTCCAGCAGCAGTGCGCTCTGAT 117
AY394563.2 CGAACCAGGGTTCAACATCCGCAAGTGGTGCGAGGTTTCCAGCAGCAGTGCGCTCTGAT 117
F1        CGAACCAGGGTTCAACATCCGCAAAGTGGTGCGAGGTTTCCAGCAGCAGTGCGCTCTGAT 117
93c       CGAACCAGGGTTCAACATCCGCAAGTGGTGCGAGGTTTCCAGCAGCAGTGCGCTCTGAT 118
5LM       CGAACCAGGGTTGACATCCGCAAAGTGGTGCGGGGGCTCCAGCTGCAGTGCGCTCTGAT 120
49H       CCAGCCAGGCTCGATATCCGGTGTGTCAGTGCTCGCCACCAAACTGCAAAGCGGCTGTT 117
          * * *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

```



```

297M      AATCTCCTTGATTTCATCAAGGATGAAAGG 147
F2        AATCCCCTTGATTTCATCAAGGATGAGAGG 146
AY394563.2 AATCTCCTTGATTTCATCAAGGATGAGAGG 146
F1        AGTCCCCTTGATTTCATCAAGGATGAGAGG 146
93c       AGTCCCCTTGATTTCATCAAGGATGAGAGG 147
5LM       AATCCGCTTGATTTCATCACGGATGAAAGG 149
49H       AATCCCCCGGTTTCATCAGGGAGGAGAGG 146
          * * * * *

```

NOTA : Os nucleotídeos idênticos são indicados por asteriscos.

AY394563.2 é referente ao número de acesso a sequência de *A. hydrophila* AH-1 no GenBank.

A figura 4 mostra o alinhamento das sequências de nucleotídeos de *ascFG* de outras estirpes para as quais o fragmento analisado compreendia uma região distinta do mesmo gene.

FIGURA 4 – ALINHAMENTO DAS SEQUENCIAS DOS AMPLICONS DE *Aeromonas* Loc 81, 44, 60 COM O GENE *ascFG* DE *Aeromonas hydrophila* ESTIRPE AH-1

```

AY394563.2      GGGTTCAACATCCGCAGAGTGGTGCGAGGTTTCCAGCAGCAGTGCGCGCTGATAATCTCC 60
Loc            GGGTTCAACATCCGCAGAGTGGTGCGAGGTTTCCAGCAGCAGTGCGCGCTGATAATCCCC 60
44ascFG        GGGTTCAACATCCGCAAAGTGGTGCGAGGTTTCCAAAATGCGTGCGCTCTGATAATCTCC 60
60            GGGTTCAACATCCGCAAAGTGGTGCGAGGTTTCCAGCATGAGTGCGCTCTGATAATCTCC 60
          ***** *
AY394563.2      TTGATTCATCAAGGATGAGAGGCGGATCAACGTGACGCATTGCGCCATGCACTCCTCTTG 120
Loc            TTGATTCATCAAGGATGAGAGGCGGATCAACATGACGCATTGCGCCATGCACTCCTCTTG 120
44ascFG        TTGATTCATCAAGGATGAAAGGCGGATCAACGTGACGCATTGCGCCATGCACTCCTCTTG 120
60            TTGATTCATCAAGGATGAAAGGCGGATCAACGTGACGCATTGCGCCATGCACTCCTCTTG 120
          *****
AY394563.2      CGCCAGCCAGTCGGCAATGGATGCGGCCTCCTGGTGGCAATGATGACCTGTTCCAGCCAG 180
Loc            CGCCAACCAGTCGGCAATGGATGCGGCCTCCTGGTGGCAATGATGACCTGTTCCAGCCAG 180
44ascFG        CGCCAGCCAGTCAGCAATGGATGCGGCCTCCTGGTGGCAATGATGACCTGTTCCAGCCAG 180
60            CGCCAGCCAGTCAGCAATGGATGCGGCCTCCTGGGGCAATGATGACCTGTTCCAGCCAG 180
          *****
AY394563.2      GGCCAGTTCTGCCAGTTGTTTTTTCAGT 208
Loc            GGCCAGTTCTGCCAGTTGTTTTTTCAGT 208
44ascFG        GGCCAGTTCTGCCAGTTGTTTTTTCAGT 208
60            GGCCAGTTCTGCCAGTTGTTTTTTCAGT 208
          *****

```

NOTA : Os nucleotídeos idênticos são indicados por asteriscos.

AY394563.2 é referente ao número de acesso a sequência de *A. hydrophila* AH-1 no GenBank.

TABELA 9 – SEQUENCIA DO GENBANK QUE PRODUZIU ALINHAMENTO SIGNIFICATIVO COM O AMPLICON *ascV* DA ESTIRPE 49H

Estirpe	Homologia	Score	Valor de e	Identidade(%)	Cobertura
49H	<i>Aeromonas veronii</i> strain MTCC 3249 AscV (<i>ascV</i>) gene, partial cds	165	4e-38	99	100

FIGURA 5 - ALINHAMENTO DA SEQUENCIA DO AMPLICON DE *Aeromonas* 49H COM O GENE *ascV* DE *Aeromonas veronii* estirpe MTCC 3249

```

gi|316890801|gb|HQ602648.1|      TCAACATCCTCGGTGGCGTCACCATCGGGGTGACCCAGAAGGGGTTATCC 50
49H                               TCAACATCCTCGGTGGCGTCACCATCGGGGTGACCCAGAAGGGGTTGTCC 50
                                *****
                                *****

gi|316890801|gb|HQ602648.1|      GCGGCCGATGCGCTGCAGCTCTACTCCATCCTGACGGTGGGTGA 94
49H                               GCGGCCGATGCGCTGCAGCTCTACTCCATCCTGACGGTGGGTGA 94
                                *****
                                *****

```

NOTA : Os nucleotídeos idênticos são indicados por asteriscos.

5.2 ENSAIOS BIOLÓGICOS

5.2.1 Ensaio de hemólise

5.2.1.1 Padronização do melhor tempo de cultura bacteriana

Para definir o melhor tempo de cultivo das bactérias para a realização do ensaio de hemólise, 9 estirpes selecionadas aleatoriamente foram cultivadas durante períodos de 4, 6, 18 e 24 horas e 2 controles *A. hydrophila* ATCC 7966 e *A. caviae* ATCC 14486. Os resultados obtidos estão representados na Tabela 10.

TABELA 10 - EFEITO DO TEMPO DE CULTIVO BACTERIANO SOBRE OS RESULTADOS DE ENSAIOS DE HEMÓLISE

Estirpe	Tempo de Cultivo (h) / Resultado ensaio de hemólise			
	4	6	18	24
ATCC 7966	+++ ¹	+++	+++	+++
ATCC 14486	-	-	-	-
01	+++	+++	+++	+++
06	++	++	++	-
14	-	+++	++	+++
42	-	-	++	-
44	+++	+++	++	+
55	-	-	-	-
67	++	++	+	+
68	++	++	+	+
74	+++	+++	++	++

NOTA: ¹Nível de hemólise quantificada qualitativamente em "+". +++ hemólise intensa, ++ hemólise intermediária, + hemólise fraca, - hemólise não observada.

O tempo de cultura que resultou no maior número de estirpes com habilidade de induzir hemólise em eritrócitos humanos frescos foi o de 18

horas. Esse tempo de cultivo bacteriano foi o escolhido para a realização dos ensaios de hemólise para as demais estirpes de *Aeromonas*.

5.2.1.2 Padronização do melhor tempo de contato dos eritrócitos com as culturas de *Aeromonas*

Para definir o tempo de contato das culturas bacterianas com os eritrócitos necessário para a observação da hemólise foram testados 4 períodos distintos de incubação: 10, 30, 60 e 120 minutos. As estirpes utilizadas para este teste foram escolhidas ao acaso. Os resultados estão representados na tabela 11.

TABELA 11 - EFEITO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO CULTURA-ERITRÓCITOS SOBRE OS ENSAIOS DE HEMÓLISE

	Período de contato das culturas com os eritrócitos (min) /Resultado ensaio de hemólise			
	10	30	60	120
Estirpes				
ATCC 7966	+++ ¹	+++	+++	+++
ATCC 14486	-	-	-	-
01	+++	+++	+++	+++
18	++	+++	+++	+++
55M	+	++	+++	+++
207M	-	-	+	++
210M	+	+++	+++	+++

NOTA: ¹Nível de hemólise quantificada qualitativamente em "+". +++ hemólise intensa, ++ hemólise intermediária, + hemólise fraca, - hemólise não observada.

O tempo de incubação das culturas bacterianas com os eritrócitos que resultou na observação da ocorrência de hemólise para o maior número de bactérias foi o de 120 minutos. Esse tempo foi escolhido para a realização dos ensaios de hemólise para as estirpes de *Aeromonas*.

5.2.1.3 Hemólise induzida pela cultura de estirpes de *Aeromonas*

A Tabela 12 mostra os resultados do ensaio de hemólise realizados com culturas de *Aeromonas*.

TABELA 12 - PADRÕES OBSERVADOS NOS ENSAIOS DE HEMÓLISE PARA ESTIRPES DE *AEROMONAS* (CONTINUA)

Estirpe	% Hemólise \pm dp	Estirpe	% Hemólise \pm dp
Ctrl negativo	2,58 \pm 0,28	55m	103,76 \pm 8,26 ***
Ctrl positivo	100,3 \pm 2,22	56	28,58 \pm 3,41 *
ATCC 7966	97,16 \pm 11,78 ***	59	5,16 \pm 3,09
ATCC 14486	4,15 \pm 0,25	60	105,61 \pm 0,56 ***
01	109,0 \pm 0,96 ***	61	78,60 \pm 9,41 ***
04	82,56 \pm 12,39 ***	61M	61,89 \pm 8,46 ***
02LM	68,36 \pm 10,07 **	62	30,14 \pm 6,16
02	3,47 \pm 0,09	63	109,02 \pm 4,9 ***
5LM	119,79 \pm 4,95 ***	64	35,17 \pm 11,34
6	22 \pm 7,16	66	75,75 \pm 11,63 ***
7	50,52 \pm 8,68 **	67	105,44 \pm 10,63 ***
8	9,22 \pm 3,26	68	39,50 \pm 9,25
8LM	49,62 \pm 5,16 *	68LM	3,36 \pm 0,06
09	36,34 \pm 5,53 *	69	13,83 \pm 5,28
10	80,78 \pm 8,03 ***	69LM	101,1 \pm 0,34 ***
10LM	39,87 \pm 8,05 ***	70	127,60 \pm 16,19 ***
11	81,68 \pm 3,31 ***	71	95,56 \pm 3,45 ***
14	67,72 \pm 7,29 ***	72	91,74 \pm 27,68 ***
16LM	118,66 \pm 3,82 ***	73	121,56 \pm 0,89 ***
18	94,71 \pm 27,94 ***	74	85,86 \pm 17,88 ***
19	115,08 \pm 4,38 ***	85M	111,63 \pm 1,17 ***
20	109,75 \pm 0,28 ***	92C	104,51 \pm 3,75 ***
22	35,11 \pm 0,84 *	92M	68,36 \pm 19,52 ***
23	42,05 \pm 6,08 **	93C	102,30 \pm 1,00 ***
25	77,04 \pm 8,49 ***	96c	83,09 \pm 14,64 ***
26	107,85 \pm 4,49 ***	97c	102,30 \pm 2,00 ***
27LM	117,91 \pm 1,05 ***	100M	74,53 \pm 19,11 ***
29	50,57 \pm 8,7 ***	207M	34,33 \pm 6,51
30	13,71 \pm 3,28	210M	99,57 \pm 9,48 ***
31	27,31 \pm 7,22	235M	48,45 \pm 1,31 ***
32	85,84 \pm 1,12 ***	242C	75,01 \pm 32,36 ***
34LM	48,44 \pm 7,93 ***	248C	28,58 \pm 0,64
35	107,89 \pm 0,65 ***	252C	51,39 \pm 22,83 **
36	105,30 \pm 6,40 ***	297M	112,63 \pm 0,71 ***
37	106,92 \pm 0,65 ***	312M	110,66 \pm 14,45 ***
38	100,39 \pm 12,13 ***	329M	92,33 \pm 31,77 ***

TABELA 12 - PADRÕES OBSERVADOS NOS ENSAIOS DE HEMÓLISE PARA ESTIRPES DE *AEROMONAS* (CONCLUSÃO)

Estirpe	% Hemólise \pm dp	Estirpe	% Hemólise \pm dp
39	89,49 \pm 4,4 ***	346M	40,33 \pm 4,5 **
40	113,47 \pm 3,12 ***	359M	59,38 \pm 18,23 *
42	107,56 \pm 6,24 ***	423M	60,64 \pm 4,0 ***
42M	45,94 \pm 1,17 ***	507M	55,30 \pm 13,54 **
43	25,46 \pm 2,92	547M	95,52 \pm 38,10 ***
44	107,43 \pm 2,12 ***	594M	105,80 \pm 5,61 ***
45	54,75 \pm 7,69 ***	F1	118,55 \pm 2,26 ***
46	68,89 \pm 1,93 ***	F2	120,84 \pm 3,08 ***
47	80,15 \pm 10,98 ***	KAROL	106,34 \pm 1,09 ***
49	34,07 \pm 1,37 *	LCR1999	115,01 \pm 21,92 ***
49H	62,92 \pm 9,33 **	LOC CN1	3,33 \pm 0,18
50	34,90 \pm 3,84 *	LOC CN15	41,25 \pm 9,89 ***
51	72,66 \pm 6,09 ***	LOC 81	112,32 \pm 1,55 ***
53	33,49 \pm 1,00 *	LOC 121	94,84 \pm 0,46 ***
55	63,61 \pm 22,02 **		

NOTA: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ em comparação com o controle negativo. Dp – desvio padrão

Das 97 estirpes de *Aeromonas* testadas apenas 15 (destacadas em negrito) não foram capazes de provocar hemólise em eritrócitos humanos frescos de forma estatisticamente significativa (Tabela 12). A estirpe padrão *A. hydrophila* ATCC 7966 apresentou intensa hemólise e a estirpe *A. caviae* ATCC 14486 ausência de hemólise como esperado.

5.2.1.4 Hemólise induzida pelos sobrenadantes das culturas de *Aeromonas*

Os resultados do ensaio de hemólise realizados com o sobrenadante de culturas de *Aeromonas* estão indicados na Tabela 13.

TABELA 13 - ATIVIDADE DOS SOBRENADANTES DE CULTURAS DE *AEROMONAS* SOBRE ERITRÓCITOS HUMANOS (CONTINUA)

Estirpe	% Hemólise \pm dp	Estirpe	% Hemólise \pm dp
Ctrl negativo	3,40 \pm 0,27	56	3,34 \pm 0,28
Ctrl positivo	101,35 \pm 1,91	59	18,58 \pm 0,60
ATCC 7966	3,35 \pm 0,11	60	78,81 \pm 16,33 *
ATCC 14486	3,60 \pm 0,15	61	2,62 \pm 0,09
01	134 \pm 2,09 ***	61M	3,26 \pm 0,23
02	3,47 \pm 0,09	62	4,50 \pm 0,71
2LM	16,69 \pm 4,1	63	96,18 \pm 32,72 ***
04	84,14 \pm 0,91 ***	64	23,87 \pm 5,33
5LM	87,69 \pm 23,45 ***	66	3,11 \pm 0,34
6	5,28 \pm 1,9	67	70,74 \pm 1,07 ***
7	3,54 \pm 0,52	68	3,63 \pm 0,51
8	3,38 \pm 0,11	68LM	3,36 \pm 0,06
8LM	8,47 \pm 3,22	69	3,29 \pm 0,03
9	6,01 \pm 1,01	69LM	4,38 \pm 1,57
10	4,46 \pm 0,34	70	116,87 \pm 6,29 ***
10LM	25,03 \pm 10,14 *	71	17,04 \pm 1,77
11	5,91 \pm 1,26	72	107,37 \pm 14,41 ***
14	3,13 \pm 0,88	73	128,99 \pm 7,56 ***
16LM	101,74 \pm 10,59 ***	74	18,97 \pm 1,67
18	94,30 \pm 0,19 ***	85M	108,5 \pm 5,67 ***
19	114,08 \pm 12,36 ***	92C	90,56 \pm 1,87 ***
20	98,27 \pm 25,27 ***	92M	11,20 \pm 1,59
22	28,41 \pm 4,83	93C	111,62 \pm 6,25 ***
23	3,74 \pm 1,20	96C	31,39 \pm 12,68
25	8,76 \pm 1,55	97C	19,43 \pm 0,91
26	72,85 \pm 3,90 ***	100M	8,83 \pm 0,19
27LM	121,84 \pm 3,8 ***	207M	4,25 \pm 1,07
29	3,93 \pm 0,78	210M	107,44 \pm 3,23 ***
30	3,23 \pm 0,35	235M	3,18 \pm 0,31
31	2,78 \pm 0,44	242C	8,16 \pm 0,08
32	69,48 \pm 17,28 **	248C	3,37 \pm 0,08
34LM	8,74 \pm 3,42	252C	7,71 \pm 2,53
35	137,46 \pm 6,43 ***	297M	130,76 \pm 8,43 ***
36	74,74 \pm 9,11 ***	312M	118,01 \pm 16 ***
37	105,58 \pm 1,87 ***	329M	14,08 \pm 5,77
38	106,64 \pm 1,43 ***	346M	6,79 \pm 1,12
39	129,97 \pm 0,031 ***	359M	11,28 \pm 4,57
40	100,59 \pm 28,46 ***	423M	2,42 \pm 0,06
42	12,61 \pm 4,69	507M	27,45 \pm 9,74 *
42M	5,26 \pm 0,83	547M	6,27 \pm 0,51
43	9,77 \pm 0,31	594M	5,15 \pm 2,40
44	90,67 \pm 0,66	F1	84,79 \pm 20,62 ***
45	19,76 \pm 7,32	F2	94,20 \pm 7,80 ***

TABELA 13 - ATIVIDADE DOS SOBRENADANTES DE CULTURAS DE *AEROMONAS* SOBRE ERITRÓCITOS HUMANOS (CONCLUSÃO)

Estirpe	% Hemólise \pm dp	Estirpe	% Hemólise \pm dp
46	15,35 \pm 0,66	KAROL	105 \pm 1,55
47	3,67 \pm 0,44	LCR1999	7,26 \pm 1,99
49H	13,90 \pm 0,87	LOC CN1	3,11 \pm 0,03
50	22,63 \pm 1,50	LOC CN15	3,25 \pm 0,28
51	30,09 \pm 2,03	LOC 81	120,26 \pm 2,91 ***
53	3,34 \pm 0,15	LOC 121	41,23 \pm 12,01 ***
55	3,46 \pm 0,51		
55M	118,78 \pm 9,5 ***		

NOTA: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ em comparação com o controle negativo

Dos 96 sobrenadantes de culturas estirpes de *Aeromonas* testadas 35 foram capazes de provocar hemólise em eritrócitos humanos frescos de forma estatisticamente significativa (Tabela 13). O sobrenadante da cultura da estirpe padrão *A. hydrophila* ATCC 7966 apresentou intensa hemólise e o da estirpe *A. caviae* ATCC 14486 ausência de hemólise como esperado.

Comparando os resultados dos ensaios de hemólise realizados com as culturas totais e com os respectivos sobrenadantes foi possível classificar as estirpes de *Aeromonas* em dois grupos distintos. Em um dos grupos, marcados em negrito na Tabela 14, a hemólise provocada pela cultura total foi similar àquela causada pelo sobrenadante das respectivas culturas, indicando a presença das toxinas com atividade hemolítica no sobrenadante. Outro grupo, contém estirpes cujas culturas totais causaram hemólise estatisticamente superior aos ensaios realizados apenas com os respectivos sobrenadantes. Nesse caso é requerida a presença das bactérias no ensaio para a ocorrência de hemólise (Tabela 14).

TABELA 14 – HEMÓLISE DA CULTURA TOTAL VERSUS SOBRENADANTE (CONTINUA)

Estirpe	Hemólise ± dp	
	Cultura total	Sobrenadante
Ctrl negativo	2,58 ± 0,28	3,40 ± 0,27
Ctrl positivo	100,3 ± 2,22	101,35 ± 1,91
ATCC 7966	97,16 ± 11,78	111,20 ± 0,79
ATCC 14486	4,15 ± 0,25	3,60 ± 0,15
01	109,0 ± 0,96	134 ± 2,09
02LM	68,36 ± 10,07	16,69 ± 4,1 *
04	82,56 ± 12,39	84,14 ± 0,91
5LM	119,79 ± 4,95	87,69 ± 23,45
07	50,52 ± 8,68	3,54 ± 0,52***
8LM	61,92 ± 6,44	8,47 ± 3,22 *
10	80,78 ± 8,03	4,46 ± 0,34 ***
11	81,68 ± 3,31	5,91 ± 1,26 ***
14	67,72 ± 7,29	3,13 ± 0,88 ***
16LM	118,66 ± 3,81	101,74 ± 10,59
18	94,71 ± 27,94	94,30 ± 0,19
19	115,08 ± 4,38	114,08 ± 12,36
20	109,75 ± 0,28	98,27 ± 25,27
23	42,05 ± 6,01	3,74 ± 1,20 *
25	77,04 ± 8,49	8,76 ± 1,55 ***
26	111,03 ± 3,84	72,85 ± 3,90
27LM	94,49 ± 0,84	121,84 ± 3,8
29	50,57 ± 8,7	3,93 ± 0,78 ***
30	13,71 ± 3,28	3,23 ± 0,35
32	85,84 ± 1,12	69,48 ± 17,28
34LM	48,44 ± 7,93	8,74 ± 3,42 *
35	107,89 ± 0,65	137,46 ± 6,43
36	84,38 ± 5,13	74,74 ± 9,11
37	106,92 ± 0,65	105,58 ± 1,87
38	106,06 ± 3,75	106,64 ± 1,43
39	89,49 ± 4,4	129,97 ± 0,031
40	90,92 ± 2,50	100,59 ± 28,46
42	86,19 ± 5,00	12,61 ± 4,69 ***
42LM	45,94 ± 1,17	5,26 ± 0,83 *
44	107,43 ± 2,12	90,67 ± 0,66
45	54,75 ± 7,69	19,76 ± 7,32 ***
46	68,89 ± 1,93	15,35 ± 0,66 ***
47	80,15 ± 10,98	3,67 ± 0,44 ***
49H	34,07 ± 1,37	13,90 ± 0,44*
51	58,23 ± 4,88	30,09 ± 2,03
55	50,97 ± 17,64	3,46 ± 0,51 **
55M	103,76 ± 8,26	118,78 ± 9,5
60	105,61 ± 0,56	78,81 ± 16,33
61	78,60 ± 9,41	2,62 ± 0,09 ***

TABELA 14 – HEMÓLISE DA CULTURA TOTAL VERSUS SOBRENADANTE (CONCLUSÃO)

Estirpe	Hemólise \pm dp	
	Cultura total	Sobrenadante
61M	61,89 \pm 8,46	3,26 \pm 0,23 ***
63	109,02 \pm 4,9	96,18 \pm 32,72
66	75,75 \pm 11,63	3,11 \pm 0,34 ***
67	105,44 \pm 10,63	70,74 \pm 1,07 **
69LM	101,1 \pm 0,34	4,38 \pm 1,57 ***
70	127,60 \pm 16,19	116,87 \pm 6,29
71	95,56 \pm 3,45	17,04 \pm 1,77 ***
72	91,74 \pm 27,68	107,37 \pm 14,41
73	121,56 \pm 0,89	128,99 \pm 7,56
74	68,80 \pm 14,32	18,97 \pm 1,67 **
85LM	111,63 \pm 1,17	108,5 \pm 5,67
92C	104,51 \pm 3,75	90,56 \pm 1,87
92M	54,77 \pm 15,64	11,20 \pm 1,59 *
93C	127,66 \pm 1,24	111,62 \pm 6,25
96C	83,09 \pm 14,64	31,39 \pm 12,68 ***
97C	102,30 \pm 2,00	19,43 \pm 0,91 ***
100M	74,53 \pm 19,11	8,83 \pm 0,19 ***
210M	99,57 \pm 9,48	107,44 \pm 3,23
235M	48,45 \pm 1,31	3,18 \pm 0,31 ***
242C	75,01 \pm 32,36	8,16 \pm 0,08 **
297M	112,63 \pm 0,71	130,76 \pm 8,43
312M	110,66 \pm 14,45	118,01 \pm 16
329M	92,33 \pm 31,77	14,08 \pm 5,77 ***
346	40,33 \pm 4,5	6,79 \pm 1,12 *
359M	59,38 \pm 18,23	11,28 \pm 4,57
423M	60,64 \pm 4,0	2,42 \pm 0,06 ***
507M	55,30 \pm 13,54	27,45 \pm 9,74 **
547M	95,52 \pm 38,10	6,27 \pm 0,51 ***
594M	105,80 \pm 5,61	5,15 \pm 2,40 ***
F1	118,55 \pm 2,26	111,26 \pm 0,87
F2	120,84 \pm 2,47	84,79 \pm 20,62
KAROL	106,34 \pm 1,09	105 \pm 1,55
LCR 1999	115,01 \pm 21,92	7,26 \pm 1,99 ***
Loc CN15	41,25 \pm 9,89	3,25 \pm 0,28*
LOC 81	112,32 \pm 1,55	120,26 \pm 2,91
LOC 121	94,84 \pm 0,46	41,23 \pm 12,01 *

NOTA: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ em comparação com a hemólise causada pela respectiva cultura total. Dp – desvio padrão.

5.2.2 Ensaio de citotoxicidade

5.2.2.1 Avaliação do potencial citotóxico das estirpes de *Aeromonas* sobre a linhagem celular HRT-18

A realização do ensaio com MTT demonstrou que das 96 estirpes testadas, 43 (44,8%) foram estatisticamente citotóxicas (estirpes marcadas em negrito). Além disso, tais estirpes foram capazes de induzir nas células de epitélio intestinal mudanças morfológicas importantes, associadas com citotoxicidade celular como arredondamento celular (perda de adesão ao seu substrato), vacuolização e a presença de *debris* celulares, ou seja, presença de fragmentos celulares (Tabela 15). Ensaio com outras estirpes, como 02, 22, 23, 31, 32, 34LM, 207M, 242C, 346M, 359M, apesar de não se mostrarem estatisticamente citotóxicas pelo teste do MTT, foram capazes de induzir alterações morfológicas nas células epiteliais intestinais. A maioria das estirpes citotóxicas induziram alterações morfológicas importantes em apenas 3 horas de incubação com as células. Na Figura 6 é possível observar a ausência de alterações morfológicas no controle de células viáveis e na estirpe *A.caviae* ATCC 14486. Também é possível observar as profundas alterações morfológicas causadas pela estirpe padrão *A.hydrophila* ATCC 7966 e pelas estirpes 20, 73 e 69, demonstrando como foram observadas as alterações morfológicas da Tabela 15.

TABELA 15 - CITOTOXICIDADE DAS ESTIRPES DE *AEROMONAS* (CONTINUA)

Estirpe	% Citotoxicidade - Média \pm dp**	Alterações celulares [#]	
		3 hr	24 hr
Controle cél. Viáveis	100,32 \pm 3,55	Sem alterações	Sem alterações
Controle cél. não viáveis	0,32 \pm 2,64	-	-
ATCC 7966	14,36 \pm 1,12	Arredondamento	Arredondamento, <i>debris</i>
ATCC 14486	98,34 \pm 19,18	Sem alterações	Sem alterações
01	27,32 \pm 2,45 ***	Arredondamento	Arredondamento
02	64,31 \pm 5,07	Sem alterações	Arredondamento
02LM	149,69 \pm 12,12	Sem alterações	Sem alterações

TABELA 15 - CITOTOXICIDADE DAS ESTIRPES DE *AEROMONAS*
(CONTINUA)

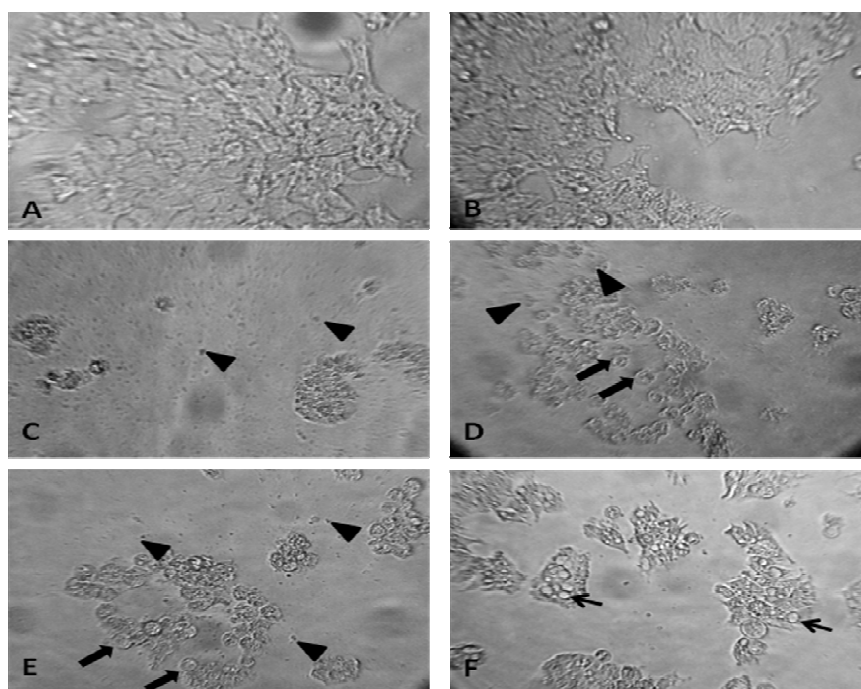
Estirpe	% Citotoxicidade - Média \pm dp**	Alterações celulares [#]	
		3 hr	24 hr
04	153,00 \pm 2,29	Sem alterações	Sem alterações
05LM	49,66 \pm 2,62 ***	Arredondamento, vacuolização	Arredondamento, vacuolização
06	109,37 \pm 17,20	Sem alterações	Sem alterações
07	98,21 \pm 9,19	Sem alterações	Sem alterações
08	97,45 \pm 1,66	Sem alterações	Sem alterações
08LM	92,42 \pm 4,18	Sem alterações	Sem alterações
09	145,77 \pm 2,29	Sem alterações	Sem alterações
10	161,96 \pm 13,01	Vacuolização	Vacuolização
10LM	99,86 \pm 6,33	Sem alterações	Sem alterações
11	96,01 \pm 4,71	Sem alterações	Vacuolização
14	144,56 \pm 10,23	Sem alterações	Vacuolização
16LM	28,03 \pm 2,17 ***	Arredondamento	Arredondamento
18	39,07 \pm 0,65 ***	Arredondamento	Arredondamento, <i>debris</i>
19	26,80 \pm 3,82 ***	Arredondamento	Arredondamento, <i>debris</i>
20	21,32 \pm 0,86 ***	Arredondamento	Arredondamento, <i>debris</i>
22	76,84 \pm 7,83	Vacuolização	Arredondamento
23	88,77 \pm 12,87	Sem alterações	Vacuolização
25	110 \pm 10,00	Sem alterações	Sem alterações
26	21,83 \pm 8,71 ***	Arredondamento, vacuolização	Arredondamento, vacuolização
27LM	33,54 \pm 9,44 ***	Arredondamento	Arredondamento
29	69,70 \pm 15,01 *	Vacuolização	Arredondamento, vacuolização
30	65,08 \pm 0,82 **	Sem alterações	Arredondamento, vacuolização
31	75,69 \pm 21,41	Sem alterações	Vacuolização
32	79,02 \pm 10,47	Sem alterações	Arredondamento
34LM	82,71 \pm 7,10	Sem alterações	Vacuolização
35	49,17 \pm 2,83 **	Vacuolização	Arredondamento, <i>debris</i>
36	41,39 \pm 1,13 ***	Arredondamento, vacuolização	Arredondamento, vacuolização
37	62,94 \pm 6,52 *	Vacuolização	Arredondamento, <i>debris</i>
38	38,43 \pm 3,82 ***	Arredondamento, vacuolização	Arredondamento, vacuolização
39	52,71 \pm 8,60 ***	Vacuolização	Arredondamento, <i>debris</i>
40	35,12 \pm 3,11 ***	Arredondamento, vacuolização	Arredondamento, vacuolização
42	52,75 \pm 7,57 ***	Arredondamento	Arredondamento
43	150,73 \pm 8,1	Sem alterações	Arredondamento
44	43,69 \pm 7,46 ***	Vacuolização	Arredondamento, <i>debris</i>
45	81,39 \pm 5,85	Sem alterações	Sem alterações
46	130,20 \pm 3,76	Sem alterações	Sem alterações
47	148,12 \pm 15,52	Sem alterações	Sem alterações
49	151,95 \pm 16,33	Sem alterações	Sem alterações
49H	103,72 \pm 26,85	Sem alterações	Sem alterações
50	80,25 \pm 5,45	Sem alterações	Sem alterações
51	138,46 \pm 4,32	Sem alterações	Sem alterações
53	137,16 \pm 3,00	Sem alterações	Sem alterações
55	94,66 \pm 5,11	Sem alterações	Sem alterações
55M	63,84 \pm 5,15 *	Vacuolização	Arredondamento, <i>debris</i>
56	110,35 \pm 5,40	Sem alterações	Sem alterações
59	165,36 \pm 8,229	Sem alterações	Sem alterações
60	127,93 \pm 3,94	Sem alterações	Sem alterações
61	155,70 \pm 39,99	Sem alterações	Sem alterações
61M	104,36 \pm 18,35	Sem alterações	Sem alterações
62	100,97 \pm 21,07	Sem alterações	Sem alterações
63	40,12 \pm 4,47 ***	Arredondamento leve	Arredondamento, <i>debris</i>
64	76,37 \pm 2,44	Sem alterações	Sem alterações

TABELA 15 - CITOTOXICIDADE DAS ESTIRPES DE *AEROMONAS* (CONCLUSÃO)

Estirpe	% Citotoxicidade - Média \pm dp**	Alterações celulares [#]	
		3 hr	24 hr
66	157,61 \pm 20,72	Sem alterações	Vacuolização leve
67	1,0 \pm 0,84***	Arredondamento intenso	Arredondamento, <i>debris</i>
68	41,42 \pm 6,9 ***	Sem alterações	Arredondamento
68LM	159,61 \pm 16,86	Sem alterações	Sem alterações
69	48,31 \pm 6,9***	Vacuolização	Vacuolização
69LM	161,79 \pm 21,76	Sem alterações	Sem alterações
70	47,69 \pm 4,44 **	Arredondamento	Arredondamento, <i>debris</i>
71	62,69 \pm 10,38 **	Sem alterações	Arredondamento, <i>debris</i>
72	45,43 \pm 2,49 **	Arredondamento	Arredondamento, <i>debris</i>
73	28,59 \pm 6,09 ***	Arredondamento	Arredondamento, <i>debris</i>
74	35,94 \pm 8,24 ***	Arredondamento	Arredondamento, <i>debris</i>
85M	34,29 \pm 10,08 ***	Arredondamento	Arredondamento, <i>debris</i>
92C	34,98 \pm 2,72 ***	Arredondamento	Arredondamento, <i>debris</i>
92M	62,31 \pm 2,50*	Sem alterações	Arredondamento, <i>debris</i>
93C	41,07 \pm 8,51 ***	Arredondamento	Arredondamento, <i>debris</i>
96C	70,66 \pm 5,80*	Sem alterações	Arredondamento, <i>debris</i>
97C	51,87 \pm 15,80 ***	Sem alterações	Arredondamento, <i>debris</i>
100M	113,75 \pm 11,15	Sem alterações	Sem alterações
207M	69,62 \pm 3,69	Sem alterações	Arredondamento
210M	47,08 \pm 11,25 ***	Arredondamento	Arredondamento, <i>debris</i>
235M	60,22 \pm 9,87 *	Vacuolização	Arredondamento, <i>debris</i>
242C	87,03 \pm 4,44	Sem alterações	Arredondamento
248C	144,64 \pm 4,31	Sem alterações	Sem alterações
252C	94,16 \pm 13,45	Sem alterações	Sem alterações
297M	28,19 \pm 20,09 ***	Arredondamento intenso	Arredondamento, <i>debris</i>
312M	46,04 \pm 10,14 ***	Arredondamento intenso	Arredondamento, <i>debris</i>
329M	44,82 \pm 7,50 ***	Sem alterações	Arredondamento, <i>debris</i>
346M	77,80 \pm 14,36	Sem alterações	Arredondamento
359M	77,18 \pm 5,49	Arredondamento	Arredondamento
423M	125,15 \pm 17,40	Sem alterações	Sem alterações
507M	133,07 \pm 6,81	Sem alterações	Sem alterações
547M	156,83 \pm 7,98	Sem alterações	Sem alterações
594M	155,43 \pm 13,84	Sem alterações	Sem alterações
F1	48,99 \pm 6,63 ***	Arredondamento, vacuolização	Arredondamento, <i>debris</i>
F2	37,68 \pm 1,83 ***	Arredondamento	Arredondamento, <i>debris</i>
KAROL	142,03 \pm 6,21	Sem alterações	Sem alterações
LCR 1999	51,56 \pm 8,03 ***	Vacuolização	Arredondamento, <i>debris</i>
LOC 81	21,75 \pm 6,81***	Arredondamento intenso	Arredondamento, <i>debris</i>
LOC CN1	130,63 \pm 2,87	Sem alterações	Sem alterações
LOC CN15	162,40 \pm 10,53	Sem alterações	Sem alterações
LOC 121	148,65 \pm 11,66	Sem alterações	Sem alterações

NOTA: Negrito:estirpes citotóxicas. #Arredondamento: arredondamento celular, perda de adesão; *debris*: fragmentos celulares. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ em comparação com o controle de células viáveis. Dp – desvio padrão

FIGURA 6 – ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS ENCONTRADAS EM CÉLULAS HRT 18 NA PRESENÇA DE ESTIRPES DE *AEROMONAS*



NOTA Alterações celulares observadas em células de epitélio intestinal (HRT 18) após incubação com o sobrenadante de estirpes de *Aeromonas*. A: controle de células viáveis; B: estirpe controle *A.caviae* ATCC 14486; C: controle *A.hydrophila* ATCC 7966; D: cepa 20; E: cepa 73; F: cepa 69. ▲ debris, ⬆ arredondamento celular, ↑ vacuolização.

A tabela 16 representa os fenótipos encontrados nas estirpes de *Aeromonas* de acordo com a espécie.

TABELA 16 - FENÓTIPOS ENCONTRADOS ENTRE AS ESTIRPES DE *AEROMONAS*

Espécie	Fenótipo	
	Citotoxicidade	Hemólise
<i>A.hydrophila</i>	76,9%	100%
<i>A.caviae</i>	28,6%	79%
<i>A.veronii sobria</i>	84,6%	100%
<i>A.trota</i>	33,3%	66,70%
<i>Aeromonas spp.</i>	37,5%	85,70%

6 DISCUSSÃO

6.1 ENSAIO GENOTÍPICO

Aeromonas são reconhecidas como causa de uma série de infecções em humanos, tais como septicemia, infecções de feridas, pneumonia, entre outras, mas estão associadas mais frequentemente com gastroenterite (BRAVO et al., 2003; AL-BENWAN et al., 2007; CHOI et al., 2008; DWIVEDI et al., 2008; AVOLIO et al., 2009; JANDA e ABBOTT 2010; NAGATA et al., 2011).

A severidade da doença está relacionada com os fatores de virulência da bactéria e o estado imunológico do paciente (MOYER 1987; ALBERT et al 2000, SOHN et al., 2007; DWIVEDI et al., 2008).

Uma forma de determinar o potencial de patogenicidade de um microorganismo é através da identificação dos seus fatores de virulência. Sabe-se que a virulência de *Aeromonas* é de origem poligênica ou multifatorial, envolvendo uma complexa interação entre as bactérias e o hospedeiro (JANDA, 1991; JANDA e ABBOTT, 2010, PABLOS et al., 2010), além disso tem sido praticamente impossível estabelecer uma classificação hierárquica dos fatores de virulência de acordo com o seu papel no processo da doença. Portanto a pesquisa da presença de vários fatores de virulência continua a ser uma ferramenta importante na compreensão da patogênese das *Aeromonas* (CHACÓN et al. 2003; SEN e RODGERS 2004; AGUILERA-ARREOLA et al. 2005).

Neste estudo 100 estirpes de *Aeromonas* pertencentes às espécies *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii* sobria e *A. trota*, e *Aeromonas* spp, foram analisadas, através da PCR, quanto a presença de 13 potenciais genes de virulência (características genotípicas), quanto a capacidade de provocar hemólise em eritrócitos humanos, e atividade citotóxica em células de epitélio intestinal em cultura (HRT-18) – (características fenotípicas).

Os resultados dos ensaios genotípicos indicados na (Tabela 4), mostram que das 100 estirpes de *Aeromonas* analisadas 96% apresentaram resultado

positivo para um ou mais dos genes testados. E não se pode excluir a possibilidade de que outros genes de virulência estejam presentes nessas estirpes considerando o arsenal de virulência descrito em *Aeromonas*.

Também se pode observar (Tabela 4) que a maioria das estirpes apresentaram de 2 a 4 genes de virulência, e que a distribuição dos fatores de virulência foi heterogênea nesses isolados.

Os genes de virulência detectados com maior frequência foram *ela* e *lip*, que codificam hidrolases extracelulares, e foram detectados respectivamente, em 83% e 79% das estirpes (Tabela 4 e Figura 2). Esses resultados são similares aos descritos por outros autores, que encontraram frequências variando de 85 a 100% (SOLER et al., 2002, SEN e RODGERS 2004, NAWAZ et al., 2010).

As infecções por *Aeromonas* têm sido ocasionalmente associadas com síndrome urêmica hemolítica, uma condição grave com risco à vida do paciente e que normalmente é associada à de *E. coli* (STEC) que são produtoras das citotoxinas Stx1 e Stx2. Já foi demonstrada a presença de genes da toxina Shiga em estirpes de *Aeromonas*. Uma estirpe ambiental de *A. veronii* sobria foi positiva para o gene *stx₁*; em outro trabalho foi demonstrado que 23,75% das *Aeromonas* estudadas foram positivas para o mesmo gene, e uma estirpe de *A. caviae* foi positiva para ambos os genes *stx₁* e *stx₂* (SNOWDEN et al., 2006; ALPERI e FIGUEIRAS et al., 2010). Esses genes são característicos de STEC e são responsáveis pelo desenvolvimento de diarreia e síndrome urêmica hemolítica (PATON e PATON 1998). Como esses genes são codificados em bacteriófagos, pode-se especular que eles sejam capazes de infectar também algumas estirpes de *Aeromonas*. Os genes *stx₁* e *stx₂* não foram detectados em nenhuma das bactérias analisadas no presente trabalho, em concordância com o resultado descrito por PABLOS e colaboradores (2009, 2010). Ainda há poucos dados sobre a incidência desses genes em *Aeromonas*, e enquanto alguns pesquisadores relatam incidência relevante, outros não detectaram genes do tipo *stx* nas bactérias analisadas. Portanto nossos dados corroboram aqueles apresentados por (PABLOS et al., 2009, 2010), sugerindo que a presença de genes do tipo *stx* não é comum em *Aeromonas*.

O gene *hlyA* foi encontrado com uma frequência de 16% nas estirpes de *Aeromonas*, em outro trabalho realizado no Brasil sua frequência foi maior 43,6% (CASTILHO et al., 2009), ZHU e colaboradores (2007) também encontraram uma frequência elevada 88%, porém a sua amostra era composta somente por *A.hydrophila*.

Neste estudo o gene *aerA* foi encontrado em 20% das estirpes, PABLO e colaboradores 2009 encontraram uma frequência muito similar 17%, enquanto que outros trabalhos reportam uma frequência maior para este gene (88%) (OTTAVIANI et al., 2011).

O gene *aer* foi encontrado somente em 3% das *Aeromonas*, em contraste com CASTILHO e colaboradores (2009) encontraram 38% em estirpes isoladas no Rio de Janeiro, e YU e CHU (2011) encontraram 44%.

Os genes *alt* e *ast* tiveram uma positividade total de 12 e 16% respectivamente. A distribuição total do gene *alt* nos isolados foi inferior a relatada por SINHA e colaboradores (2004) (71,9%), enquanto que para o gene *ast* foi superior à descrita por eles, 2,4%. ALBERT e colaboradores (2000) relataram valores de 16% para ambos os genes, similares aos encontrados no presente trabalho. Em estudo realizado no Brasil, a incidência para *alt* e *ast* foi 24,8 e 26,5% respectivamente em estirpes isoladas no Rio de Janeiro (CASTILHO et al., 2009).

O gene *act* teve uma prevalência de 21% nas estirpes de *Aeromonas*, similar à encontrada por SINHA e colaboradores (2004), que detectaram o gene da enterotoxina citotóxica em 20,1% das estirpes analisadas. Contudo esses dados diferem daqueles descritos por OTAVIANI e colaboradores (2011) que encontraram uma porcentagem de 55% para *act*.

Estes dados indicam que a distribuição desses genes é heterogênea, e varia de acordo com a amostra analisada, incluindo a distribuição geográfica, composição em termos de espécies, refletindo diferenças na virulência e/ou composição genética.

Para os genes marcadores dos sistemas de secreção do tipo 6 (*vasH*) e tipo 3 (*ascV*, *ascFG*), a prevalência total foi de 19% e 16%, respectivamente. A importância desses sistemas de secreção para a virulência é reconhecida, mas ainda há poucos estudos sobre a sua frequência entre as estirpes de *Aeromonas*. Para o TTSS, a frequência dos genes *ascV* (7%) e *ascFG* (16%)

foi inferior a encontrada por CHACON e colaboradores (2004) que reportaram 50% de positividade para esses genes. Entretanto um estudo recente não encontrou nenhuma estirpe positiva para o gene *ascFG* (PABLOS et al., 2010). Até o momento este é o primeiro trabalho que reporta a frequência do T6SS em estirpes de *Aeromonas*.

Quando se compara a distribuição dos genes de virulência considerando as espécies de *Aeromonas* (Tabela 5), verifica-se uma nítida diferença entre elas.

Em relação ao número de genes de virulência representados em cada espécie, o grupo de *A. caviae* contém 11 dos 13 genes analisados, seguido por *A. hydrophila* (10), *Aeromonas* spp (9), *A. veronii* sobria (6), e *A. trota* com apenas 2. Entretanto a frequência desses genes entre as espécies também variou substancialmente (Tabela 6).

Na espécie *A. hydrophila*, exceto por uma estirpe na qual não foi identificado nenhum dos genes analisados, todas as outras (92%) continham entre 4 a 10 genes de virulência. Nove genótipos foram identificados (Tabela 6). O elevado número de genes de virulência nestas estirpes sugere que as bactérias deste grupo são as que apresentam maior potencial de virulência. Este achado confirma que esta espécie possui uma gama mais ampla de genes de virulência que as outras espécies de relevância clínica (AGUILERA-ARREOLA et al., 2007, OTTAVIANI et al., 2011). A maior frequência foi observada para os genes da elastase e lipase (92,3%), que também foram detectados com frequências elevadas em *A. caviae* (93,6% e 92%, respectivamente) e *Aeromonas* spp (87,5%). Em *A. veronii* sobria as frequências foram menores (34,4% e 7,7%, respectivamente), e em *A. trota* apenas o gene da lipase foi encontrado, com frequência de 33,3%. Estes dados refletem o genótipo mais comumente encontrado, que foi *ela/lip*, predominante entre estirpes da espécie *A. caviae* (Tabela 6). As proteases extracelulares lipase e elastase desempenham um papel importante na patogênese de *Aeromonas* durante a invasão do hospedeiro e no estabelecimento da infecção (ZHU et al., 2007).

A. hydrophila também foram as bactérias que apresentaram maior frequência para os genes *hly* (84,6%) e *aer* (15,3%), que codificam hemolisinas. Embora 38,5% das estirpes de *A. hydrophila* tenham o gene *aerA* as maiores frequências foram observadas para *A. veronii* sobria e *A. trota* (69,2% e 66,7%, respectivamente), nas quais apenas este gene de hemolisina foi encontrado. Em *A. caviae* os 3 genes de hemolisinas foram encontrados, mas em baixa frequência. E no grupo *Aeromonas* spp *aer* não foi detectado.

Para *A. hydrophila* uma frequência muito semelhante, em torno de 86%, foi reportada para *hly* por outros autores, enquanto que para a espécie *A. caviae* a frequência do gene *hlyA* variou de 4-20% (SINHA et al., 2004; CASTILHO et al., 2009). Porém em contraste com nossos resultados alguns autores verificaram a presença deste gene nas espécies *A. trota* (10%) e *A. veronii* sobria (12-24%) (HEUZENROEDER, WONG e FLOWER, 1999; SINHA et al., 2004).

O gene *aer* foi encontrado somente em 3 estirpes de *Aeromonas* (3%), sendo 2 estirpes de *A. hydrophila* e 1 de *A. caviae*. Em contraste CASTILHO e colaboradores (2009) encontraram este gene em 38% das *Aeromonas* analisadas, sendo 17% delas do complexo *A. hydrophila*, em todas as estirpes do complexo *A. sobria* e em somente uma estirpe de *A. caviae*. Contudo, utilizando o mesmo par de *primers* aqueles autores encontraram um produto de amplificação não esperado de 400pb em 78% das *A. caviae* e em 3 estirpes de *A. hydrophila*. Este fragmento foi seqüenciado e verificou-se que apresentava homologia com vários genes de hemolisinas de *Aeromonas*. Outro estudo também tem demonstrado a variabilidade genética dos genes das hemolisinas (GRANUN et al., 1998).

No presente trabalho *A. caviae* apresentou baixa prevalência dos genes hemolíticos (Tabelas 5). Portanto a atividade hemolítica detectada em aproximadamente 80% das estirpes (Tabela 12) pode ser atribuída a outras toxinas hemolíticas não pesquisadas. Além disso, variantes dos genes das hemolisinas podem existir e não serem detectados por PCR utilizando os *primers* descritos para as hemolisinas mais comuns (CASTILHO et al., 2009). Assim estudos complementares são necessários para a detecção molecular das hemolisinas nas estirpes de *Aeromonas* e também para entender o polimorfismo desses genes.

A atividade β -hemolítica em muitas *Aeromonas* está associada com a presença dos genes *hlyA* e/ou *aerA*, mas o gene da enterotoxina citolítica (*aer*) também tem sido associado com a β -hemólise. Esses genes podem ser identificados pela reação em cadeia da polimerase (PCR) (CASTILHO et al., 2009; SEETHALAKSHMI, SUBASHKUMAR e SAMINATHAN, 2008, , FALCON et al., 2006). Na prática, porém, os métodos biológicos como a atividade hemolítica em células a 37°C, e a análise dos efeitos citotóxicos em células de mamíferos, geralmente são usados para detectar a atividade hemolítica (CASTILHO et al., 2009, FALCON, et al., 2006). Juntos esses métodos tem contribuído para a caracterização de hemolisinas, que são importantes fatores de virulência envolvidos na patogênese de *Aeromonas* spp.

O genótipo *aerA*+/ *hlyA*+ e em alguns casos *aerA*+/ *hlyA*- foram descritos como sendo preditores de doenças diarreicas humanas, e a combinação de ambos os genes é mais comum em *A. hydrophila* do que em *A. caviae* (HEUZENROEDER WONG e FLOWER, 1999. PABLOS et al., 2010). Quando a presença de ambos os genes foi investigada, encontramos 4 estirpes (30,8%) de *A. hydrophila* com o genótipo *aerA*+/ *hlyA*+ e uma estirpe (7,7%) com os três genes hemolíticos *aer*+/*aerA*+/ *hlyA*+, enquanto que nenhuma estirpe de *A. caviae* apresentou este genótipo. Estes dados sugerem que *A. hydrophila* é mais virulenta.

Poucos estudos têm reportado a caracterização molecular dos genes de virulência na espécie de *A. caviae*, apesar do aumento da importância desta espécie como patógeno humano. Por esta razão primers utilizados para detectar genes em *A. hydrophila* são também utilizados para *A. caviae*. Conseqüentemente a detecção dos genes de virulência na espécie de *A. caviae* pode ser subestimada se considerarmos apenas resultados da PCR. Portanto os resultados da PCR precisam ser interpretados juntamente com testes fenotípicos, métodos moleculares alternativos, como hibridização e seqüenciamento de DNA (CASTILHO et al., 2009). No presente trabalho além da detecção dos genes de virulência por PCR, também foram realizados ensaios de citotoxicidade e atividade hemolítica em eritrócitos humanos para determinar a presença de características de virulência nas estirpes de *Aeromonas* (Tabelas 12 a 15).

Também foi observada em *A. hydrophila* a maior frequência para os genes que codificam as enterotoxinas citotônicas *alt* (61,5%) e *ast* (84,6%), seguida de *Aeromonas* spp (37,5% e 12,5%). Uma baixa frequência foi observada em *A. caviae*, e esses genes estavam ausentes em *A. trota* e *A. veronii* sobria (Tabela 5 e 6). Estes resultados são similares a outros apresentados na literatura (AGUILERA-ARREOLA et al., 2007). CASTILHO e colaboradores (2009) encontraram uma frequência menor desses genes em *A. hydrophila* (14,2 e 35,7%) respectivamente, enquanto que para *A. caviae* a frequência do gene *alt* foi maior 21,4% e do gene *ast* foi similar.

Vários estudos têm demonstrado que as enterotoxinas contribuem para a virulência de *Aeromonas*. Os genes das enterotoxinas citotônicas termo-lábil e termo estável (*alt* e *ast*) estão envolvidos no desenvolvimento de gastroenterites (SHA, KOZLOVA e CHOPRA, 2002; GALINDO et al., 2006). Estirpes de *Aeromonas* com positividade para ambos os genes *ast* e *alt*, podem induzir sinergicamente uma diarreia severa (ALBERT et al., 2000). Em nosso trabalho a associação *ast/alt* foi claramente observada em 50% das estirpes de *A. hydrophila* e em uma estirpe *Aeromonas* spp.(Tabela 6). Resultados semelhantes com uma associação de 52 e 54% já foram encontrados em *A. hydrophila* (ALBERT et al., 2000; SEN E RODGERS 2004; AGUILERRA-AREOLA 2005). Porém alguns estudos também encontraram essa associação *ast/alt* em outras espécies, como *A. veronii* sobria 38%, *A. caviae* 66%, *A. trota* 64% (ALBERT et al., 2000). Estes dados mostram mais uma vez que aparentemente *A. hydrophila* apresenta maior potencial de virulência.

O gene *act* apresentou maior frequência em *A. veronii* sobria sendo detectado em todas (100%) as estirpes da espécie (Tabela 6). Também foi detectado em *A. hydroplila* (30,8%) e com menor frequência (6,3%) em *A. caviae*. SINHA e colaboradores (2004) também encontraram maior frequência deste gene nas *A. veronii* sobria (84%), *A. hydrophila* (40%) e *A. caviae* (1,4%). A positividade total encontrada em nosso trabalho foi de 21%, em contrapartida OTAVIANI e colaboradores (2011) encontraram uma porcentagem maior 55%. A enterotoxina citotóxica (*act*) contribui significativamente para a patogênese de *Aeromonas*. Quatro atividades biológicas foram descritas para essa toxina, como, atividade hemolítica, citotóxica, enterotóxica bem como a letalidade de ratos (ROSE, HOUSTON e KUROSKY 1989). XU e colaboradores (1998)

relataram a destruição completa das micro vilosidades do epitélio intestinal de ratos por ação da toxina *act* de *Aeromonas*, indicando a sua importância no processo de diarreia.

Muitas bactérias gram negativas entre elas as *Aeromonas*, usam sistemas de secreção de proteínas (TTSS e T6SS) para inserir proteínas efetoras diretamente no citosol de células hospedeiras, sendo ambos considerados importantes para a virulência (SHA et al., 2005, 2007; KHAJANCHI et al., 2009).

Os marcadores para os sistemas de secreção T3SS e T6SS também foram encontrados com maior frequência em *A. hydrophila* em respectivamente, 53 e 61,5% das estirpes (tabela 5). Não estavam presentes em *A. trota*, e nas outras espécies a distribuição foi heterogênea. Em *A. caviae* marcadores para ambos os sistemas foram detectados, embora com frequências diferentes sendo 1,6% para o TTSS e 11,1% para T6SS. Em *A. veronii* sobria apenas o TTSS foi encontrado, e em parcela importante das estirpes. Por fim, em *Aeromonas* spp o marcador para o T6SS foi encontrado em 50% das estirpes ao passo que o T3SS apenas em 12,5% delas.

O TTSS foi encontrado mais frequentemente em estirpes de *A. hydrophila* e *A. veronii*, do que em *A. caviae* (VILCHES et al., 2004; KHAJANCHI et al., 2010), isto pode explicar a baixa detecção desses genes nos nossos isolados, pois a maioria pertence a espécie *A. caviae*. CHACON e colaboradores (2004) não encontraram os genes *ascV* e *ascFG* em isolados intestinais de *A. caviae*. Em relação ao gene *ascV*, ele foi positivo em 38,4% das estirpes de *A. veronii* sobria, enquanto nas outras espécies ele foi ausente ou pouco frequente. KHAJANCHI e colaboradores (2010) encontraram positividade para o gene *ascV* em 57%, 33,3% e 0% das estirpes do grupo *A. hydrophila*, *A. veronii-A. sobria* e *A. caviae-A. media* respectivamente. Estes resultados são similares em relação ao encontrado para *A. veronii* sobria e *A. caviae*, mas contrastam com o observado para *A. hydrophila* (Tabela 5).

Uma possível explicação para a baixa detecção do TTSS nas *Aeromonas* analisadas neste trabalho, é que os genes deste sistema possuem uma grande variação em suas seqüências podendo resultar em uma sub notificação dos mesmos (SILVER e GRAF, 2009). Entretanto nenhuma estirpe

positiva para o gene *ascFG* foi encontrada por PABLOS e colaboradores (2010), o que pode sugerir que a sua distribuição não é uniforme.

A presença de *ascFG* e ausência de *ascV* em algumas estirpes de *A. hydrophila* e *A. veronii* sobria (Tabela 6) chama a atenção, uma vez que todos são componentes do T3SS. Para verificar se os fragmentos amplificados realmente correspondiam a *ascFG* e não eram produtos de amplificação inespecífica, os mesmos foram seqüenciados, confirmando que se tratava de *ascFG* (Figuras 3 e 4). O mesmo foi observado para uma estirpe de *A. veronii* sobria. Possíveis explicações para a ausência de amplificação dos genes *ascV* podem incluir substituições de nucleotídeos na região de anelamento dos iniciadores, e até mesmo a presença de um T3SS incompleto.

A ocorrência de um TTSS degenerado foi encontrado em *A. hydrophila*, mas mesmo assim essas estirpes foram capazes de provocar infecção, porém sendo menos virulentas (CARVALHO-CASTRO et al., 2010).

Vários estudos tem demonstrado a presença e o mecanismo de patogenicidade do T6SS em estirpes de *Aeromonas* (SUAREZ et al., 2008; KHAJANCHI et al., 2009; SUAREZ et al., 2010), porém até o momento não foi encontrado nenhum outro trabalho relatando a prevalência deste sistema nessas bactérias. Em nosso estudo encontramos 19% do total dos isolados com o gene *vasH* (pertencente a maquinaria do T6SS), sendo este presente em 61,5% das *A. hydrophila* e 11,1% das *A. caviae*, enquanto que nas espécies *A. trota* e *A. veronii sobria* o gene foi ausente.

A maioria das estirpes de *A. caviae* foi positiva somente para os genes da lipase e elastase, poucas (12,7%) apresentaram outros genes associados com virulência, ao contrário de *A. hydrophila*. Uma explicação para esta diferença é que a última bactéria é a espécie de *Aeromonas* melhor conhecida e para a qual a maioria dos *primers* foi desenvolvida. Os *primers* para lipase e elastase utilizados neste trabalho foram desenvolvidos para amplificar uma região conservada desses genes nas espécies de *A. hydrophila* e *A. caviae* (SEN e RODGERS 2004), o que poderia justificar a elevada frequência dos mesmos entre as estirpes da última.

AGUILERA-ARREOLA e colaboradores (2007) em análise da diversidade genética por meio de ERIC-PCR, mostraram que *A. caviae* é uma espécie altamente diversificada. Outros trabalhos também tem demonstrado

um alto grau de variabilidade genética ao nível de espécie nas *Aeromonas*, usando RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (THOMAS et al., 2009; YOUSSEF et al., 2010; MIYATA et al. 1995), PFGE (Pulsed Field Gel-Electrophoresis) (BORCHARDT, STEMPER e STANDRI 2003; PABLOS et al., 2010; O'HICHER, OLIVIER, POWELL, 2000), análise comparativa das seqüências dos genes *housekeeping* (MARTINEZ-MURCIA 2011; SOLER et al., 2004).

Assim, a baixa positividade dos outros genes de virulência nesta espécie poderia ser explicada pelo fato de que as *Aeromonas* possuem uma diversidade genética muito grande, e os *primers* utilizados podem não reconhecer os genes homólogos da espécie de *A. caviae*.

Em relação a *A. trola*, uma estirpe apresentou somente o gene *aerA*, e outra o genótipo *aerA/lip* (Tabela 6). Isto sugere para esta espécie o possível envolvimento de outros fatores de virulência não investigados neste estudo e confirma o papel relevante das aerolisinas na patogênese (CASTILHO et al., 2009).

6.2 ENSAIOS FENOTÍPICOS

Ensaio fenotípico para a detecção da atividade hemolítica e possível ação citotóxica das estirpes de *Aeromonas* foram realizadas para complementar os estudos sobre virulência.

Das 97 estirpes testadas para o ensaio de hemólise com a cultura total somente 15 não foram capazes de provocar lise nos eritrócitos humanos. Entre elas 13 (20,6%) estirpes da espécie *A. caviae*, 1 (33,3%) estirpe de *A. trola* e 1 estirpe *Aeromonas* spp. Estes dados são referentes aos ensaios com a cultura total, uma vez que nesta condição foi observada atividade hemolítica para um maior número de bactérias. A atividade hemolítica foi observada na maioria das estirpes (84,5%) indica que essas bactérias apresentam potencial de virulência.

Entre as 13 estirpes nas quais não foi observada atividade hemolítica, 3 continham genes hemolíticos sendo eles *aer*, *aerA* ou *act*. Mas nenhum continha o gene *hly*. Uma das hipóteses para esta discrepância é que a

quantidade de toxina produzida foi muito pequena, insuficiente para lisar os eritrócitos nas condições testadas. Outra explicação seria que essas estirpes contêm os genes, porém eles não são expressos ou contêm mutações que afetam a atividade da proteína. Resultados semelhantes foram descritos por outros autores, que justificam isso por mutações nos genes hemolíticos afetando o domínio responsável pelo fenótipo hemolítico ou ainda a não expressão dos genes (WANG et al., 2003; LI et al., 2011). Também há evidências de que as estirpes de *A.caviae* precisam de um tempo mais prolongado para a produção de toxinas (CASTILHO et al., 2009). De acordo com KARUNAKARANI e DEVI (1994) as estirpes de *A.caviae* podem produzir toxinas na fase estacionária de crescimento. Como provavelmente nas condições preconizadas no presente trabalho as células estavam no final da fase exponencial de crescimento, isso pode ter afetado a detecção da atividade hemolítica nessas 13 estirpes.

Em contrapartida 50 estirpes (51,5%) com fenótipo hemolítico não apresentaram os genes *act*, *aer*, *aerA* e *hlyA*. A alta taxa de atividade hemolítica detectada nas *Aeromonas* pode ser atribuída a outras toxinas hemolíticas, além disso, variantes dos genes das hemolisinas podem existir, e por essa razão não podem ser detectados por PCR (WANG et al., 2003; LI et al., 2011). Outro fator é que a amostra analisada é constituída predominantemente por *A. caviae*, e a maioria dos *primers* utilizados foi descrita para *A. hydrophila*, o que pode resultar na não detecção desses genes devido à diferenças na composição genética entre essas espécies.

KHAJANCHI e colaboradores (2010) observaram atividade hemolítica em 100% das estirpes do grupo *A. hydrophila* e do grupo *A.veronii-A.sobria*, enquanto que somente 3% das estirpes do grupo *A.caviae-A.media* produziram hemólise. Nós também encontramos todas as estirpes de *A.hydrophila* e *A.veronii sobria* com atividade hemolítica, seguida por *A.caviae* (79,4%) e *A.trota* (66,7%). Para as duas primeiras os resultados confirmam os achados de KHAJANCHI e colaboradores, mas em contrapartida há uma grande diferença na frequência de *A. caviae*. Isto pode sugerir que as bactérias da amostra analisada no presente trabalho sejam mais virulentas.

O ensaio de hemólise demonstrou que as estirpes de *Aeromonas* sintetizam hemolisinas em determinados períodos de tempo de cultivo. Os

níveis mais intensos de hemólise foram observados quando culturas de 18 horas foram utilizadas na incubação com os eritrócitos (Tabela 10). Esses resultados estão de acordo com outros estudos da literatura que demonstraram que *Aeromonas* produzem hemolisinas desde a fase lag até a fase estacionária, porém o maior nível de produção está na fase log (KARUNAKARANI e DEVI, 1994). O tempo de incubação das culturas bacterianas com os eritrócitos que resultou na melhor observação da ocorrência de hemólise foi o de 120 minutos (2 horas) a 37°C (Tabela 11), KARUNAKARANI e DEVI (1994) também reportam essas condições resultando em maior atividade hemolítica.

Oitenta e quatro por cento das estirpes foram capazes de produzir hemólise quando utilizamos a cultura total, mas no ensaio livre de células (sobrenadante) apenas 36,5% das estirpes foram hemolíticas. MARTINS, MARQUEZ, YANO (2002) também encontraram uma diminuição da atividade hemolítica quando foi utilizado o sobrenadante. Esses resultados podem ser explicados pela presença de diferentes hemolisinas, umas necessitam do contato celular com os eritrócitos para serem sintetizadas, e outras estão associadas com a liberação das toxinas para o meio extracelular (WRETLIND e HEDEN, 1973). Alternativamente, a hemolisina pode ser liberada em uma forma inativa no sobrenadante das culturas, e mais tarde ser ativada por proteases produzidas pelas células, o que poderia explicar a inibição desta atividade biológica (citado por MARTINS, MARQUEZ, YANO (2002).

Alguns dos fatores de virulência mais importantes das *Aeromonas* são as hemolisinas e as enterotoxinas, as quais envolvem atividade citotóxica *in vitro*.

Para determinar a atividade citotóxica em *Aeromonas* foram utilizadas células de epitélio intestinal em cultura (células epiteliais de adenocarcinoma colorretal, HRT-18) (Tabela 15).

A presença de alterações celulares foi observada em 3 horas e 24 horas de incubação, quando o efeito citotóxico máximo foi observado (Tabela 15). As alterações encontradas foram a ocorrência de arredondamento celular, que demonstra perda de adesão ao seu substrato, vacuolização e *debris*, essas alterações também foram descritas por outros autores (NAMDARI E BOTTONE, 1990; BALAJI, JESUDASON E SRIDHARAN, 2004).

Quarenta e quatro por cento das estirpes de *Aeromonas* foram consideradas citotóxicas. As espécies *A.veronii* sobria e *A.hydrophila* foram as que apresentaram maior número de estirpes citotóxicas (84,6% e 76,9%) respectivamente, seguido por *A.trota* (33,3%) e *A.caviae* (28,6%) (Tabela 15). Outros trabalhos relatam frequência similar em *A.veronii* (89%) e *A.hydrophila* (72%), porém em *A.caviae* foi descrita atividade citotóxica em frequência mais elevada (86%) (MARTINS, MARQUEZ e YANO, 2002).

Vinte e cinco genótipos diferentes foram observados nas estirpes citotóxicas o que sugere que a citotoxicidade é multifatorial e pode envolver os produtos de um número de genes diferentes agindo sozinho ou em conjunto (WANG et al., 2003).

Finalmente, no presente estudo, nós observamos que em geral as estirpes de *A.hydrophila* e *A.veronii sobria* contem maior número de genes de virulência e maior atividade hemolítica e citotóxica comparado com as outras espécies, o que também foi observado em outro trabalho realizado no Brasil (GUERRA et al., 2007).

Esses resultados reforçam que existem diferenças quanto à virulência entre as espécies de *Aeromonas*, ou de isolados da mesma espécie, e mostram que a determinação da presença de genes de virulência pode ser um valioso indicador nas análises epidemiológicas. Os ensaios fenotípicos foram essenciais para demonstrar a presença de atividades tóxicas, o que foi verificado inclusive em estirpes nas quais não foram encontrados os genes de virulência analisados.

7 CONCLUSÕES

Todas as estirpes de *Aeromonas* analisadas apresentaram características associadas com virulência.

A prevalência dos genes de virulência entre as estirpes foi *ela* 83%, *lip* 79%, *act* 21%, *aerA* 20%, *vasH* 19%, *hlyA*, *asFG* e *ast* 16%, *alt* 12%, *ascV* 7%, *aer* 3%, *stx*₁ e *stx*₂ 0%. Oitenta e quatro por cento apresentaram atividade hemolítica, e 44% citotoxicidade estatisticamente significativa.

A maioria (75%) das estirpes apresentou entre 2 a 4 genes de virulência.

Elevada heterogeneidade foi observada quanto à distribuição dos genes de virulência entre as espécies e estirpes.

Diversos genótipos foram encontrados nas espécies de *Aeromonas*, em *A. hydrophila* (13 estirpes) 9 diferentes genótipos; em *A. trota* (3 estirpes) 2 genótipos; *A. veronii* sobria (13 estirpes) 7 genótipos e *A. caviae* (63 estirpes) 10 genótipos.

Os genótipos mais comuns entre as espécies foram: *A. hydrophila* - *vasH/alt/ascFG/lip/ela/hlyA/ast* (3 estirpes); *A. caviae* e *Aeromonas* spp - *lip ela* (respectivamente em 45 e 3 estirpes); *A. veronii* sobria - *act/ela/aerA* e *ascV/ascFG/act/aerA* (3 estirpes cada).

As estirpes de *A. hydrophila* e *A. veronii* sobria contem mais genes de virulência e maior atividade hemolítica e citotóxica, sugerindo que são potencialmente mais virulentas que *A. caviae* e *A. trota*.

As estirpes de *A. hydrophila* foram as que apresentaram maior número de genes de virulência combinados, o que sugere maior potencial de virulência.

Determinação da presença de genes de virulência pode ser um valioso indicador nas análises epidemiológicas.

Ensaio fenotípico e genotípico foram essenciais e complementares nos estudos de virulência.

REFERÊNCIAS

ABBOTT, S.L.; CHEUNG, W.K.W.; JANDA, J.M. The Genus *Aeromonas*: Biochemical Characteristics, Atypical Reactions, and Phenotypic Identification Schemes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 6, p. 2348-2357, 2003.

ABBOTT, S.L.; SELI, L.S.; CATINO, M. JR.; HARTLEY, M.A.; JANDA, J.M. Misidentification of Unusual *Aeromonas* Species as Members of the Genus *Vibrio*: a Continuing Problem. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, n.4, p.1103-1104, 1998.

AGUILERA-ARREOLA, M.A.; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C.; ZÚÑIGA, G.; FIGUERAS, M.J.; CASTRO-ESCARPULLI, G. *Aeromonas hydrophila* clinical and environmental ecotypes as revealed by genetic diversity and virulence genes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 242, p.231–240, 2005.

AGUILERA-ARREOLA, M.G.; RODRÍGUEZ, C.H.; ZÚÑIGA, G.; FIGUERAS, M.J.; GARDUÑO, R.A.; CASTRO-ESCARPULL, G. Virulence potential and genetic diversity of *Aeromonas caviae*, *A. veronii* and *A. hydrophila* clinical isolates from Mexico and Spain: A comparative study, **Canadian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 7, p. 877-887 2007.

ALAVANDI, S.V.; ANANTHAN, S. Biochemical characteristics, serogroups and virulence factors of *Aeromonas* species isolated from cases of diarrhoea and domestic water samples in Chennai. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 21, n.4, p.233-238, 2003.

AL-BENWAN, K.; ABBOTT, S.; JANDA, M.; HUYS, G.; ALBERT, M.J. Cystitis Caused by *Aeromonas cavia*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, n.7, p. 2348-2350, 2007.

ALBERT, M.J.; ANSARUZZAMAN, M.; TALUKDER, K.A.; CHOPRA, A.K.; KUHN, I.; RAHMAN, M.; FARUQUE, A.S.G.; ISLAM, M.S.; SACK, R.B.; MOLLBY, R. Prevalence of enterotoxin genes in *Aeromonas* spp. isolated from children with diarrhea, healthy controls, and the environment. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, n.10, p.3785-3790, 2000.

ALPERI, A.; FIGUERAS, M.J. Human isolates of *Aeromonas* possess Shiga toxin genes (*stx1* and *stx2*) highly similar to the most virulent gene variants of *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology and Infection**, 2010. doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03203.x

ALTSCHUL, S. F. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**. v.25, n.17, p.3389-3402, 1997.

ANDELOVA, A.; PORAZILOVA, I.; KREJCI, E. Correspondence. *Aeromonas* agar is useful selective medium for isolating aeromonads from faecal samples. **Journal of Medical Microbiology**, v.55, p.1605-1606., 2006.

ANGUITA, J., APARICIO, L.R., NAHARRO, G. Purification, Gene Cloning, Amino Acid Sequence Analysis, and Expression of an Extracellular Lipase from an *Aeromonas hydrophila* Human Isolate. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 59, n. 8, p. 2411-2417, 1993.

ARAUJO, R.M.; ARRIBAS R.M.; PARES R. Distribution of *Aeromonas* species in waters with different levels of pollution. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 71, p.182-186, 1991.

ARAÚJO, V.S.; PAGLIARES, V.A.; QUEIROZ, M.L.P.; FREITAS-ALMEIDA, A.C. Occurrence of *Staphylococcus* and enteropathogens in soft cheese commercialized in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v.92, p.1172-1177, 2002.

ARAVENA-ROMAÑ, M., HARNETT, G.B., RILEY, T.V., INGLIS, T.J.J., CHANG, B.J. *Aeromonas aquariorum* Is Widely Distributed in Clinical and Environmental Specimens and Can Be Misidentified as *Aeromonas hydrophila*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 8, p. 3006–3008, 2011.

AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A.; STRUHL, K. **Short Protocols in Molecular Biology**. John Wiley & Sons, 2ed., v. 1, p.2-10 – 2-11, 1992.

AVOLIO, M.; SPISA, C.L.; MOSCARIELLO, F.; ROSA, R.; CAMPORESE, L. *Aeromonas hydrophila* ecthyma gangrenosum without bacteraemia in a diabetic man: the first case report in Italy. **Le Infezioni in Medicina**, n.3, p.184-187, 2009.

BALASSIANO, I.T.; BASTOS, M.C.F.; MADUREIRA, D.J.; SILVA, I.G.; FREITAS-ALMEIDA, A.C.; OLIVEIRA, S.S. The involvement of tetA and tetE tetracycline resistance genes in plasmid and chromosomal resistance of

Aeromonas in Brazilian strains. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.102, n.7, p.861-866, 2007.

BALAJI, V.; JESUDASON, M.V.; SRIDHARAN, G. Cytotoxin testing of environmental *Aeromonas* spp. in Vero cell culture. **Indian Journal Medical Research**, v. 119, p. 186-189, 2004.

BERNHEIMER, A.W.; AVIGAD, L.S. Partial Characterization of Aerolysin, a Lytic Exotoxin from *Aeromonas hydrophila*. **Infection and Immunity**, .9, n.6, p. 1016-1021, 1974.

BÖNEMANN,G.; PIETROSIUK,A.; MOGK, A. Tubules and donuts: a type VI secretion story. **Molecular Microbiology**, v.76, n.4, p. 815–821, 2010.

BORRELL, N.; ACINAS,S.G.; FIGUERAS, M.G.; MARTÍNEZ-MURCIA , A.J. Identification of *Aeromonas* Clinical Isolates by Restriction Fragment Length Polymorphism of PCR-Amplified 16S rRNA Genes. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, n. 7, p.1671-1674, 1997.

BRAVO, L.; MORIER, L.; CASTAÑEDA, N.;RAMÍREZ, M.; SILVA, M.; CASTRO-ESCARPULLI, G. *Aeromonas*: an emerging pathogen associated with extraintestinal infection in Cuba. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v.55, n.3, p.208-9, 2003.

BUCKLEY, J. T., L. N. HALASA, K. D. LUND, AND S. MACINTYRE. Purification and some properties of the hemolytic toxin aerolysin. **Canadian Journal of Biochemistry**, v. 59, p. 430–436, 1981.

CARNEIRO, M.S.; ROSSI JUNIOR, O.D. Bactérias do gênero *Aeromonas* no fluxograma de beneficiamento do leite tipo a e seu comportamento frente à ação de antimicrobianos. **Arquivo do Instituto Biológico**, v.73, n.3, p.271-276, 2006.

CARVALHO-CASTRO, G.A.; LOPES,C.O.; LEAL, C.A.G.; CARDOSO,P.G.; LEITE, R.C.; FIGUEIREDO, H.C.P. Detection of type III secretion system genes in *Aeromonas hydrophila* and their relationship with virulence in Nile tilapia. **Veterinary Microbiology** (2010) doi:10.1016/j.vetmic.2010.01.021

CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L.A. Host-Pathogen Interactions: Redefining the Basic Concepts of Virulence and Pathogenicity. **Infection and Immunity**, v.67, n.8, p.3703-3713, 1999.

CASCON, A.; YUGUEROS, J.; TEMPRANO, A.; HERNANZ, M.S.C.; LUENGO, J.M.; NAHARRO, G. A Major Secreted Elastase Is Essential for Pathogenicity of *Aeromonas hydrophila*. **Infection and Immunity**, v.68, n. 6, p. 3233-3241, 2000.

CASTILHO, M.C.B.; CASTRO, T.L.A.; ARAUJO, V.S.; TRAJANO, R.S.; SANTOS, P.A.; PIMENTA, P.M.C.; LUCHEZE, K.; MELO, J.T.B.; GONÇALVES, A.M.; NOGUEIRA, R.T.; LUNA, M.G.; FREITAS-ALMEIDA, A.C. High frequency of hemolytic and cytotoxic activity in *Aeromonas* spp. isolated from clinical, food and environmental in Rio de Janeiro, Brazil. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 96, p. 53–61, 2009.

CASTRO-ESCARPULLI, G.; AGUILERA-ARREOLA, M.A.; CEREZO, S.G.; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C.H.; CHACÓN, M.R.; FALGÁS, L.S.; OZORES, G.A.; SALVAT, M.J.F. El género *Aeromonas*. Un patógeno importante en México? *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, v. 22, n. 4, 2002.

CHACON, M.R.; FIGUERAS, M.J.; , CASTRO-ESCARPULLI, G.; SOLER, L.; GUARRO, J. Distribution of virulence genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 84, p 269–278, 2003.

CHACÓN, M.R.; SOLER, L.; GROISMAN, E.A.; GUARRO, J.; FIGUERAS, J.M. Type III Secretion System Genes in Clinical *Aeromonas* Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, v.42, n.3, p.1285-1287, 2004.

CHOI, J.P. LEE, S.O.; KWON, H.H.; KWAK, Y.G.; CHOI, S.H.; LIM, S.K.; MI NA KIM, JEONG, J.Y.; CHOI, S.H.; WOO, J.H.; KIM, Y.S. Clinical Significance of Spontaneous *Aeromonas* Bacterial Peritonitis in Cirrhotic Patients: A Matched Case-Control Study. **Clinical Infectious Diseases**, v.47, p.66-72, 2008.

CHOPRA, A. K.; XU, X.J.; RIBARDO, D.; GONZALEZ, M.; KUHL, K.; PETERSON, J.W.; HOUSTON, C.W.. The cytotoxic enterotoxin of *Aeromonas hydrophila* induces proinflammatory cytokine production and activates arachidonic acid metabolism in macrophages. **Infection and Immunity**, v.68, n.5, p.2808-2818, 2000.

CHOPRA, A. K.; HOUSTON, C. W. Enterotoxins in *Aeromonas* associated gastroenteritis. **Microbes and Infections**, v.1, p.1129-1137, 1999.

CHOPRA, I.; ROBERTS, M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.65, p.232-260, 2001.

CHOPRA, A.K., HOUSTON, C.W., PETERSON, J.W., JIN, G.F. Cloning, expression, and sequence analysis of a cytolytic enterotoxin gene from *Aeromonas hydrophila*. **Canadian Journal Microbiology**, v. 39, n. 5, p. 13–523, 1993.

COELHO M.I.S.; MENDES, E.S.; CRUZ, M.C.S.; BEZERRA, S.S.; SILVA, R.P.P. Avaliação da qualidade microbiológica de águas minerais consumidas na região metropolitana de Recife, Estado de Pernambuco. **Acta Scientiarum. Health Sciences**, v.32, n.1, p. 1-8, 2010.

COLWELL, R.R.; MACDONELL M.T.; LEY, J. Proposal to Recognize the Family *Aeromonadaceae* fam. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.36, n.3, p. 473-477, 1986.

CORNELIS, G. R.; VAN GIJSEEM, F. Assembly and function of type III secretory systems. **Annual Review of Microbiology**, v.54, p. 735–774, 2000.

DAILY, O.P.; JOSEPH, S.W.; COOLBAUGH, J.C.; WALKER, R.I.; MERRELL, B.R.; ROLLINS, D.M.; SEIDLER, R.J.; COLWELL, R.R.; LISSNER, C.R. Association of *Aeromonas sobria* with Human Infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 13, n. 4, p.769-777, 1981.

DEODHAR L.P.; SARASWATHI K.; VARUDKAR, A. *Aeromonas* spp and their association with human diarrhea disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v.29, p.853- 856, 1991.

DI BARI, M.; HACHICH, E.M.; MELO, A.M.J.; SATO, M. I. Z. *Aeromonas* spp. and microbial indicators in raw drinking water source. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n.3, p. 516-521, 2007.

DWIVEDI, M.; MISHRA, A.; PRASAD, A.; AZIM, A.; SINGH, R.K.; BARONIA, A.K.; PRASAD, K.N.; DWIVEDI, U.N. *Aeromonas caviae* Septicemia in Immunocompetent Gastrointestinal Carriers. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.12, n.6, p.547-548, 2008.

ENDER, P.T.; DOLAN, M.J. Pneumonia Associated with Near Drowning. **Clinical Infectious Diseases**, v.25, p.896-907, 1997.

EUZÉBY, J.P.M. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. Disponível em <www.bacterio.cict.fr> Acesso em 04 de abril de 2010.

EVANGELISTA-BARRETO, N.S.; CARVALHO, F.C.T.; FERNANDES, R.H.S.; REIS, C.M.F.; RODRIGUES, D.P. Characterization Of *Aeromonas* Species Isolated From An Estuarine Environment. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.41, p.452-460, 2010.

EVANGELISTA-BARRETO, N.S.; VIEIRA, R.H.S.F.; CARVALHO, F.C.T.; TORRES, R.C.O.; SANTÁNNIA, E.S.; RODRIGUES, D.P.; REIS, C.M.F. *Aeromonas* spp. isolated from oysters (*Crassostrea Rhizophorea*) from a natural oyster bed, Ceará, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.48, n.3, p. 129-133, 2006.

FALCÓN, R.; CARVALHO, H.F.; PINTO, P.; GATTI, M.S.V; YANO, T. Acción de la enterotoxina citotóxica en la patogénesis de *Aeromonas hydrophila*. **Biotecnología Aplicada**, v.21, n.4, p.253-259, 2004.

FALCÓN, R.; CASTRO, T.A.; LUNA, M.G.; FREITAS-ALMEIDA, A.C.; YANO, T. Detection of Hemolysins in *Aeromonas* spp. Isolates From Food Sources: PCR Analysis and Biological Activity. **Food-Borne Pathogens**, v.21, 2006.

FERGUSON, M.R.; XU, X.J.; HOUSTON, C.W.; J.PETERSON, W.; COPPENHAVER, D.W.; POPOV, V.L; CHOPRA, A.K. Hyperproduction, purification, and mechanism of action of the cytotoxic enterotoxin produced by *Aeromonas hydrophila*. **Infection and Immunity**, v.65, n.10, p.4299-4308, 1997.

FIGUERAS, J.M.; ALPERI, A.; SAAVEDRA, M.A.; KO, W.C.; GONZALO, N.; NAVARRO, M.; MARTÍNEZ-MURCIA, A.J. Clinical Relevance of the Recently Described Species *Aeromonas aquariorum*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.47, n.11, p. 3742-3746, 2009.

FIGUERAS, M.J.; ALDEA, M.J.; FERNANDEZ, N.; ASPIROZ, C.; ALPERI, A.; GUARRO, J. *Aeromonas* hemolytic uremic syndrome. A case and a review of the literature. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.58, n. 2, p.231-234, 2007.

FIVAZ, M., ABRAMI, L., TSITRIN, Y., VAN DER GOOT, F.G. Aerolysin from *Aeromonas hydrophila* and related toxins. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 257, p. 35-52, 2001.

FUNADA, H.; MATSUDA, T. *Aeromonas* Bacteremia in Patients with Hematologic Diseases. **Internal Medicine**, v.36, n.3, p.171-174, 1997.

GALINDO, C.L.; SHA, J.; FADL, A.A.; PILLAI, L.L. CHOPRA, A.K. Host immune responses to *Aeromonas* virulence factors. **Current Immunology Reviews**, v. 2, n.1, p.13-26, 2006.

GALINDO, C.L.; FADL, A.A.; SHA, J.; GUTIERREZ, C.; POPOV, V.L. BOLDOGH, I.; AGGARWAL, B.B.; CHOPRA, A.K. *Aeromonas hydrophila* Cytotoxic Enterotoxin Activates Mitogen-activated Protein Kinases and Induces Apoptosis in Murine Macrophages and Human Intestinal Epithelial Cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 37597–37612, 2004.

GARIBAY, R.I.A.; AGUILERA-ARREOLA, M.G.; OCAÑA, A.N.; CEREZO, S.G.; MENDOZA, M.S.; LÓPEZ, J.M.; CAMPOS, C.E.; CRAVIOTO, A.; CASTRO-ESCARPULLI, G. Serogroups, K1 antigen, and antimicrobial resistance patterns of *Aeromonas* spp. strains isolated from different sources in Mexico. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.101, n.2, p.157-161, 2006.

GÓMEZ-GARCÉS, J.L.; SAÉZ, D.; ALMAGRO, M.; FERNÁNDEZ-ROMERO, S.; MERINO, F.; CAMPOS, J.; OTEO, J. Osteomyelitis associated to CTX-M-15-producing *Aeromonas hydrophila*: First description in the literature. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 70, p. 420–422, 2011.

GOÑI-URRIZA, M.; PINEAU, L.; CAPDEPUY, M.; ROQUES, C.; CAUMETTE, P.; QUENTIN, C. Antimicrobial resistance of mesophilic *Aeromonas* spp. isolated from two European rivers. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v.46, p.297-301, 2000.

GUANASEKARAN, L. AMBALKAR, S.; SAMARJII, R.A.; QAMRUDDIN, A. Post-traumatic osteomyelitis due to aeromonas species. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v.7, n.2, p. 163-165, 2009.

GUERRA, I.M.F.; FADANELLI, R.; FIGUEIRÓ, M.; SCHREINER, F.; DELAMARE, A.P.L.; WOLLHEIM, C.; COSTA, S.O.P.; ECHEVERRIGARAY, S.. *Aeromonas* associated diarrhoeal disease in south

Brazil: prevalence, virulence factors and antimicrobial resistance. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p.638-643, 2007.

GRANUM, P.E.; O'SULLIVAN, K.; TOMAÈS, J.M.; ÒRMEN, O. Possible virulence factors of *Aeromonas* spp. from food and water. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 21, p.131-137, 1998.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analyses program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**. v.41,p.95-98, 1999.

HEUZENROEDER, M.W.; WONG, C.Y.F.; FLOWER, R.L.P. Distribution of two hemolytic toxin genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp.: correlation with virulence in a suckling mouse model. **FEMS Microbiology Letters**, v.174, n.1, p.131-136, 1999.

HOFER, E.; REIS, C.M.F.; THEOPHILO, G.N.D.; CAVALCANTI, V.O.; LIMA, N.V.; HENRIQUES, M.F.C.M. Envolvimento de *Aeromonas* em surto de doença diarreica aguda em São Bento do Una, Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.39, n. 2, p.217-220, 2006.

HORNEMAN, A. J.; ALI, A.; ABBOTT, S. L. *Aeromonas*. In MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; JORGENSEN, J.H.; LANDRY, M.L.; PFALLER, M.A. **Manual of Clinical Microbiology**. American Society for Microbiology Press:Washington D.C., 9ed., v.1, p.716-721, 2007.

HOWARD,S.P., GARLAND, W.J.,GREEN,M.J.,BUCKLEY, J.T. Nucleotide Sequence of the Gene for the Hole-Forming Toxin Aerolysin of *Aeromonas hydrophila*. **Journal of Bacteriology**, v. 169, n. 6, p. 2869-2871, 1987.

HUA, H.T.; BOLLET, C.; TERCIAN, S.; DRANCOURT, M.; RAOULT1, D. *Aeromonas popoffii* Urinary Tract Infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 11, p.5427-5428, 2004.

HUNT, L.K.; OVERMAN, T.L.; OTERO, R.B. Role of pH in oxidase variability of *Aeromonas hydrophila*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.13, p.1054-1059, 1981.

JANDA, J. M. Recent Advances in the Study of the Taxonomy, Pathogenicity, and Infectious Syndromes Associated with the Genus *Aeromonas*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 4, n. 4, p. 397-410, 1991.

JANDA, J. M.; ABBOTT S.L. The Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Pathogenicity, and Infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 1, p. 35-73, 2010.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S.L. Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: an expanding panorama of species, disease presentations, and unanswered questions. **Clinical Infectious Diseases**, v.27, p.332-344, 1998.

KARUNAKARANI, T.; DEV, B.G. Characterisation of haemolytic activity from *Aeromonas caviae*. **Epidemiology and Infection** v.112, 291-298, 1994.

KHAJANCHI, B.K.; SHA, J.; KOZLOVA, E.V.; EROVA,T.E.; SUAREZ, G.; SIERRA, J.C.; POPOV, V.L.; HORNEMAN, A.J.; CHOPRA, A.K. N-Acylhomoserine lactones involved in quorum sensing control the type VI secretion system, biofilm formation, protease production, and in vivo virulence in a clinical isolate of *Aeromonas hydrophila*. **Microbiology**, v. 155, p.3518–3531, 2009.

KHAJANCHI, B.K.; FADL, A.A.; BORCHARDT,M.A.; BERG,R.L.; HORNEMAN, A.J.; STEMPER, M.E.; JOSEPH, S.W.; MOYER, N.P.; SHA, J.; CHOPRA, A.K. Distribution of Virulence Factors and Molecular Fingerprinting of *Aeromonas* Species Isolates from Water and Clinical Samples: Suggestive Evidence of Water-to-Human Transmission. **Applied and Environmental Microbiology**, v.76, n. 7, p. 2313–2325, 2010.

KINGOMBE, C.I.B.; D'AOUST, J.Y.; HUYS,G.; HOFMANN,L.; RAO,M.; KWAN, J. Multiplex PCR Method for Detection of Three *Aeromonas* Enterotoxin Genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 2, p. 425–433, 2010.

KIVANC, M., YILMAZ, M., DEMIR, F. The occurrence of *Aeromonas* in drinking water, tap water and the porsuk river. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.42, p. 126-131, 2011.

LAMY, B.; KODJO, A.; LAURENT, F.; COLBVH. Identification of *Aeromonas* isolates by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, n. xx, p. xxx–xxx, 2011.

LI,J.; NI,X.D.; LIU,Y.J.; LU,C.P. Detection of three virulence genes *alt*, *ahp* and *aerA* in *Aeromonas hydrophila* and their relationship with actual virulence to zebrafish. **Journal of Applied Microbiology**, n.110, p. 823–830, 2011.

MA,A.T.; MCAULEY,S.; PUKATZKI, S.; MEKALANOS, J.J . Translocation of a *Vibrio cholerae* Type VI Secretion Effector Requires Bacterial Endocytosis by Host Cells. **Cell Host & Microbe**, v. 5, p. 234–243, 2009.

MARTIN-CARNAHAN, A.; JOSEPH, S.W. *Aeromonas*. In BRENNER, D. J. et al. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*., Nova Iorque, EUA: Springer, v.2, parte B, p.556-578, 2005.

MARTINEZ-MURCIA, A.J.; MONERA, A.; SAAVEDRA, M.J.; ONCINA,R.; LOPEZ-ALVAREZ, ERICA LARA, M.; FIGUERAS, M.J. Multilocus phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas* .**Systematic and Applied Microbiology**, v. 34,n.3,p.189-199,2011.

MARTINS, L.M.; MARQUEZ, R.M.; YANO, T. Incidence of toxic *Aeromonas* isolated from food and human infection. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.32, p.237-242, 2002.

MENCACCI, A.; CENCI, E.; MAZZOLLA, R.; FARINELLI, S.; D'ALO` , F.; VITALI, M.; BISTONI, F. *Aeromonas veronii* biovar *veronii* septicaemia and acute suppurative cholangitis in a patient with hepatitis B. **Journal of Medical Microbiology**, v.52, p.727-730, 2003.

MISHRA S.; NAIR, B.G.; BHADRA, R.K.; SIKDER, S.N.; PAL, S.C. Comparison of a selective media for primary isolation of *Aeromonas* species from human and animal feces. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, p. 2040-2043, 1987.

MOYER, P.N. Clinical significance of *Aeromonas* species isolated from patients with diarrhea. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, n.11, p.2044-2048, 1987.

MOSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. **Journal of Immunology Methods**, v. 65, p. 55-63,1983.

MIYATA M, AOKI T, INGLIS V, YOSHIDA T, ENDO M. RAPD analysis of *Aeromonas salmonicida* and *Aeromonas hydrophila*. **Journal Applied of Bacteriology**, v.79, n.2, p.181-5, 1995.

NAGATA, K., TAKESHIMA, Y., TOMII, K., IMAI, Y. Fulminant Fatal Bacteremic Pneumonia due to *Aeromonas hydrophila* in a Non-Immunocompromised Woman. **Internal Medicine**, n. 50, p. 63-65, 2011.

NAMDARI, H.;BOTTONE, E.J. Cytotoxin and Enterotoxin Production as Factors Delineating Enteropathogenicity of *Aeromonas caviae*. **Journal of Clinical Microbiology**,v.28, n.8, p. 1796-1798, 1990.

NAWAZ, M.; KHAN , S.K.; KHAN , A.A.; SUNG , K.; TRAN , Q.; KERDAHI , K.; STEELE, R. Detection and characterization of virulence genes and integrons in *Aeromonas veronii* isolated from catfish. **Food Microbiology**, v. 27, p327-331, 2010.

O'HICI B, OLIVIER G, POWELL R.Genetic diversity of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* demonstrated by random amplified polymorphic DNA and pulsed-field gel electrophoresis analyses. **Dis Aquat Organ.**, v.39, n.2, p.109-19, 2000.

OTTAVIANI ,D.; PARLANI,C.; CITTERIO,B.; MASINI,L.; LEONI,F.; CANONICO,C.; SABATINI,L.; BRUSCOLINI,F.; PIANETTI, A. Putative virulence properties of *Aeromonas* strains isolated from food, environmental and clinical sources in Italy: A comparative study. **International Journal of Food Microbiology**, n. 144, p.538–545, 2011.

OVERMAN,T.L.; KESSLER, J. F.; SEABOLT, J. P. Comparison of API 20E, API Rapid E, and API Rapid NFT for identification of members of the family *Vibrionaceae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.22, n.5, p.778-781, 1985.

PABLOS, M.; RODRÍGUEZ-CALLEJA, J.M.; SANTOS, J.A.; OTERO, A.; GARCÍA-LÓPEZ , M.L. Occurrence of motile *Aeromonas* in municipal drinking water and distribution of genes encoding virulence factors. **International Journal of Food Microbiology**, v.135, p.158-164, 2009.

PABLOS, M.; REMACHA, M.A.; RODRÍGUEZ-CALLEJA, J.M.; SANTOS, J.A.; OTERO, A.; GARCÍA-LÓPEZ, M.L. Identity, virulence genes, and clonal relatedness of *Aeromonas* isolates from patients with diarrhea and drinking water. **European Journal Clinical Microbiology Infectious Diseases**. DOI 10.1007/s10096-010-0982-3

PARKER, J.L.; SHAW, J.G. *Aeromonas* spp. Clinical microbiology and disease. **Journal of Infection**, v.62, p.109-118, 2011.

PATON, A.; PATON, J.C. Detection and Characterization of Shiga Toxigenic *Escherichia coli* by Using Multiplex PCR Assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, Enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfbO111*, and *rfbO157*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 598–602, 1998.

PAZZAGLIA, G.; SACK, R.B.; SALAZAR, E.; YI, A.; CHEA, E.; LEON-BARUA, R.; GUERRERO, C.E.; PALOMINO, J. High frequency of coinfecting enteropatogens in *Aeromonas* associated diarrhea of hospitalized Peruvian infants. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n.6, p.1151-1156, 1991.

PEREIRA S.C.; AMORIM, S.D.; SANTOS, A.F.M.; REIS, C.M.F.; THEOPHILO, G.N.D.; RODRIGUES, D.P. Caracterização de *Aeromonas* spp isoladas de neonatos hospitalizados. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.41, n.2, p.179-182, 2008.

PINNA, A.; SECHI, L.A.; ZANETTI S.; USAI, D.; CARTA, F. *Aeromonas caviae* Keratitis Associated with Contact Lens Wear. **Ophthalmology**, v.111, n.2, p.348-351, 2004.

REINES, H.D.; COOK, F.V. Pneumonia and Bacteremia due to *Aeromonas hydrophila*. **CHEST**, v.80, n.3, p.264-267, 1981.

ROSE, J.M.; HOUSTON, C.W.; KUROSKY, A. Bioactivity and Immunological Characterization of a Cholera Toxin- Cross-Reactive Cytolytic Enterotoxin from *Aeromonas hydrophila*. **Infection and Immunity**, v.57, n.4, p. 1170-1176, 1989.

ROSSJOHN, J.; FEIL, S.C.; MCKINSTY, W.J. Aerolysin—A Paradigm for Membrane Insertion of Beta-Sheet Protein Toxins?. **Journal of Structural Biology**, v, 121, p. 92–100, 1998.

SALYERS, A.A.; WHITT, D.D. **Bacterial Pathogenesis**. American Society for Microbiology Press: Washington D.C., 1ed, p. 30-46, 1994.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F. e MANIATIS, T. Molecular cloning - a laboratory manual. New York: CSH, 1989.

SANCHEZ-CEPEDES, J.; FIGUERAS, M.J.; ASPIROZ, C.; ALDEA, M.J.; TOLEDO, M.; ALPERI, A.; MARCO, F.; VILA, J. Development of imipenem resistance in an *Aeromonas veronii* biovar *sobria* clinical isolate recovered from a patient with cholangitis. **Journal of Medical Microbiology**, v.58, n.4, p. 451-455, 2009.

SATCHELL, K.J.F. Bacterial Martyrdom: Phagocytes Disabled by Type VI Secretion after Engulfing Bacteria. **Cell Host & Microbe**, v.5, n.3, p.213-214, 2009.

SCHEFFER, J., KONIG, W., BRAUN, V., GOEBEL, W. Comparison of four hemolysin-producing organisms (*Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytogenes*) for release of inflammatory mediators from various cells. **Journal of Clinical Microbiology**, n. 26, p. 544-55, 1988.

SCHMIDT, A.S. BRUUN, M.S.; LARSEN, J.L.; DALSGAARD, D. Characterization of class 1 integrons associated with R-plasmids in clinical *Aeromonas salmonicida* isolates from various geographical areas. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.47, p. 735-743, 2001.

SEETHALAKSHMI, I.; SUBASHKUMAR, R.; SAMINATHAN, P. Distribution of putative virulence genes in *Aeromonas hydrophila* and *aeromonas salmonicida* isolated from marketed fish samples. **Journal of fisheries and Aquatic Science**, v. 3, n. 2 p. 145-151, 2008.

SEN, K.; RODGERS, M. Distribution of six virulence factors in *Aeromonas* species isolated from US drinking water utilities: a PCR identification. **Journal of Applied Microbiology**, v.97, p.1077-1086, 2004.

SHA, J.; KOZLOVA, E.V.; CHOPRA, A.K. Role of various enterotoxins in *Aeromonas hydrophila*-induced gastroenteritis: generation of enterotoxin gene-deficient mutants and evaluation of their enterotoxic activity. **Infection and Immunity**, v.70, n.4, p.1924-1935, 2002.

SHA, J.; PILLAI, L.; FADL, A.A.; GALINDO, C.L.; EROVA, T.E.; CHOPRA, A.K. The Type III Secretion System and Cytotoxic Enterotoxin Alter the Virulence of *Aeromonas hydrophila*. **Infection and Immunity**, v.73, n.10, p. 6446-6457, 2005.

SINGH, C.V.; SANYAL, S.C. Enterotoxicity of clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp. **Journal of Medical Microbiology**, v.35, p.269-272, 1992.

SINHA, S.; SHIMADA, T.; RAMAMURTHY, T.; BHATTACHARYA, S.K.; YAMASAKI, S.; TAKEDA, Y.; NAIR, G.B. Prevalence, serotype distribution, antibiotic susceptibility and genetic profiles of mesophilic *Aeromonas* species

isolated from hospitalized diarrhoeal cases in Kolkata, India. **Journal of Medical Microbiology**, v.53, p.527–534, 2004.

SNOWDEN, L.; WERNBACHER, L.; STENZEL, D.; TUCKER J.; MCKAY, D.; O'BRIEN, M.; KATOULI, M. Prevalence of environmental *Aeromonas* in South East Queensland, Australia: a study of their interactions with human monolayer Caco-2 cells. **Journal of Applied Microbiology**, v.101, n. 4, p. 964-975, 2006.

SOHN, H.J.; NAM, D.H.; KIM, Y.S.; PAIK, H.J.; Endogenous *Aeromonas hydrophila* endophthalmitis in an immunocompromised patient. **Korean Journal of Ophthalmology**, v.21, p.45-47, 2007.

SOLER, L.; FIGUERAS, M.J.; CHACON, M.R.; VILA, J.; MARCO, F.; MARTINEZ-MURCIA, A.J.; GUARRO, J. Potential virulence and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas popoꝑi* recovered from freshwater and seawater. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 32, p.243-247, 2002.

SOLER, L.; YANEZ, M.A.; CHACON, M.R.; AGUILERA-ARREOLA, M.G.; CATALAN, V.; FIGUERAS, M.J.; MARTÍNEZ-MURCIA, A.J.; Phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas* based on two housekeeping genes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 1511–1519, 2004.

SUAREZ, G.; SIERRA, J.C.; SHA, J.; WANG, S.; EROVA, T.E.; FADL, A.A.; FOLTZ, S.M.; HORNEMAN, A.J.; CHOPRA, A.A. Molecular Characterization of a Functional Type VI Secretion System from a Clinical Isolate of *Aeromonas hydrophila*. **Microbial Pathogenesis**, v.44, n.4, p.344-361, 2008.

SUAREZ, G.; SIERRA, J.C.; EROVA, T.E.; SHA, J.; HORNEMAN, A.J. CHOPRA, A.K. A Type VI Secretion System Effector Protein, VgrG1, from *Aeromonas hydrophila* That Induces Host Cell Toxicity by ADP Ribosylation of Actin. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 1, p. 155–168, 2010.

SUREK, M.; VIZZOTTO, B.S.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O.; DALLAGASSA, C.B.; FARAH, S.M.S.S.; FADEL-PICHETH, C.M.T. Identification and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas* spp. isolated from stool samples of Brazilian subjects with diarrhoea and healthy controls. **Journal of Medical Microbiology**, v.59, p.373-374, 2010.

THOMAS, P.C.; DIVYA, P.R.; CHANDRIKA, V.; PAULTON, M.P. Genetic Characterization of *Aeromonas hydrophila* using Protein Profiling and RAPD PCR. **Asian Fisheries Science**, v. 22, p.763-771, 2009.

THOMPSON, J. D., HIGGINS, D. G., GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. v.22, n.22, p.4673-4680, 1994.

TSAI, Y.G.; HUANG, K.C.; HUANG, T.J.; HSU, R.W.W.; Fatal Necrotizing Fasciitis Caused by *Aeromonas sobria* in Two Diabetic Patients. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v.467, n.3, p.846-849, 2009.

VALLY, H.; WHITTLE, A.; CAMERON, S.; DOWSE, G.K.; WATSON, T. Outbreak of *Aeromonas hydrophila* Wound Infections Associated with Mud Footbal. **Clinical Infectious Diseases**, v.38, n.8, p.1084-9, 2004.

VILA, J.; MARCO, F.; SOLER, L.; CHACON, M.; FIGUERAS, M.J. In vitro antimicrobial susceptibility of clinical isolates of *Aeromonas caviae*, *Aeromonas hydrophila*, and *Aeromonas veronii* biotype sobria. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v.49, p. 701-702, 2002.

VILA, J.; RUIZ, J.; GALLARDO, F.; VARGAS, M.; SOLER, L.; FIGUERAS, M.J.; GASCON, J. *Aeromonas* spp. and traveler's diarrhea: clinical features and antimicrobial resistance. **Emerging Infectious Diseases**, v.9, n.5, p.552-555, 2003.

VILCHES, S.; URGELL, C.; MERINO, S.; CHACO'N, M.R.; SOLER, L.; CASTRO-ESCARPULLI, G.; FIGUERAS, M.J.; TOMA, J.M. Complete Type III Secretion System of a Mesophilic *Aeromonas hydrophila* Strain. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.11, p. 6914-6919, 2004.

VILLARI, P. CRISPINO, M.; MONTUORI, P.; STANZIONE, S. Prevalence and molecular characterization of *Aeromonas* spp. in ready-to-eat foods in Italy. **Journal of Food Protection**, v.63, n.12, p.1754-1757, 2000.

WANG, G., CLARK, C.G., LIU,C., PUCKNELL,C., MUNRO, C.K., KRUK,T.M.A.C., CALDEIRA,R., WOODWARD,D.L., RODGERS, F.G. Detection and Characterization of the Hemolysin Genes in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* by Multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 3, p. 1048–1054, 2003.

WRETLIND, B.; HEDEN, L. Formation of Extracellular Haemolysin by *Aeromonas hydrophila* in Relation to Protease and Staphylolytic Enzyme. **Journal of General Microbiology** , v. 78, p.57-65, 1973.

WONG, C. Y. F.; HEUZENROEDER, M. W.; FLOWER, R. L. P. Inactivation of two haemolytic toxin genes in *Aeromonas hydrophila* attenuates virulence in a suckling mouse model. **Microbiology**, v.144, p.291-298, 1998.

XU, XIN-J.; FERGUSON, M.R.; POPOV, V.L.; HOUSTON, C.W.; PETERSON, J.W.; CHOPRA, A.K. Role of a Cytotoxic Enterotoxin in *Aeromonas*-Mediated Infections: Development of Transposon and Isogenic Mutants. **Infection and Immunity**, v.66, n.8, p.3501-3509, 1998.

ZHU, D., LI, A., WANG, J., LI, M., CAI, T., HU, J. Correlation between the distribution pattern of virulence genes and virulence of *Aeromonas hydrophila* strains. **Frontiers of Biology in China**, v. 2, n. 2, p. 176–179, 2007.

YU e CHU. Molecular quantification of virulence gene-containing *Aeromonas* in water samples collected from different drinking water treatment processes. **Environ Monit Assess**, v.176, p. 225–238, 2011.